

Simbiosis pasto-hongo endófito: patrones regionales y su relación con los herbívoros

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias

Ignacio Matías Hernández-Agramonte Caballero
Lic. Biología - Universidad Autónoma de Madrid - 2009

Lugar de trabajo: IFEVA-FAUBA



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis

María Semmartin

Ingeniera Agrónoma, 1993, Facultad de Agronomía UBA, Argentina.

Doctora en Ciencias Agropecuarias, 2004, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Co-directora

Marina Omacini

Licenciada en Ciencias Biológicas. 1990. Centro de Altos Estudios en Ciencias Exactas (CAECE).

Doctora en Ciencias Agropecuarias, 2005, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Consejero de Estudios

Pedro E. Gundel

Ingeniero Agrónomo, 2004, Facultad de Agronomía UBA, Argentina.

Doctor en Ciencias Agropecuarias, 2009, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

JURADO DE TESIS

James Francis Jr. White

Licenciado en Ciencias biológicas/botanica (Auburn University, USA)

Doctor en Micología/Botánica (The University of Texas at Austin USA)

María Victoria Novas

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires, Argentina)

Martín Andrés Nuñez

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Comahue at Bariloche, Argentina)

Doctor en Ecología y biología evolutiva (The University of Tennessee)

Fecha de defensa de la tesis: 20 de 03 de 2017

Dedicado a:

A mis padres, a Judhit, a mi hermano Juan y a Julio.

Agradecimientos:

Quiero agradecer a todos los actores que han sido responsables de que esta tesis se pudiera realizar:

Primero agradezco a mi comité consejero por darme la oportunidad de realizar esta tesis bajo su supervisión, y por todo lo que me han enseñado durante este proceso. También quería agradecer a todos los compañeros investigadores y becarios del IFEVA que me han ayudado con sus consejos o en los muestreos y en el desarrollo de los experimentos. También quiero agradecer especialmente al grupo de Martin Aguiar por permitirme acompañarles a Río Mayo y ayudarme a realizar uno de los experimentos; al grupo de Enrique Chaneton por permitirme acompañarles a la Depresión del Salado y así completar uno de los lugares de muestreo, a Virginia Massara Paletto, Viviana Nakamatsu y Valeria Pecile por ayudar con el muestreo en Trelew, al igual que Victoria Vaieretti por la gran ayuda que recibí en el muestreo de pastizales de altura en la Quebrada del Condorito (Córdoba). Por último, me gustaría agradecer al Conicet y a la Agencia de Ciencia y Tecnología por la financiación obtenida, que me permitió realizar la tesis, al IFEVA y la FAUBA por la el espacio y la infraestructura para realizar mi doctorado, y para terminar al INTA (estaciones experimentales de Río Mayo y Concepción del Uruguay) por su gran colaboración en varios de mis experimentos.

Declaración de originalidad:

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

Publicaciones derivadas de esta tesis:

Hernández Agramonte I.M. y Semmartin M. 2016. The role of grazing intensity and preference on grass-fungal endophyte symbiosis in a Patagonian steppe. *Journal of Arid Environments* 134: 122-124.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo I: Introducción general y objetivos de la tesis	1
Introducción:	1
Relación de la simbiosis con el contexto abiótico y biótico.....	2
Objetivos, hipótesis y predicciones	5
Organización de la tesis.....	7
Capítulo II: Patrones regionales de la simbiosis a lo largo de gradientes ambientales.....	8
Introducción.....	8
Metodología.....	10
Resultados	15
Discusión	21
Capítulo III: Importancia de la intensidad del pastoreo y la palatabilidad para el mantenimiento de las simbiosis en una estepa semiárida	24
Introducción.....	24
Metodología.....	25
Resultados	27
Discusión	29
Capítulo IV: Resistencia, cambios en la preferencia del herbívoro doméstico mediada por la simbiosis.....	31
Introducción.....	31
Metodología.....	32
Resultados	36
Discusión	40
Capítulo V: Resistencia, cambios en la preferencia de invertebrados mediada por la simbiosis.....	42
Introducción.....	42
Metodología.....	42
Resultados	46
Discusión	47
Capítulo VI: Tolerar, efecto de la simbiosis sobre la capacidad de compensar la biomasa removida por herbivoría.....	49
Introducción.....	49

Metodología.....	50
Resultados	52
Discusión	56
Capítulo VII: Discusión general.....	58
¿Cómo es la distribución de la simbiosis en poblaciones silvestres a lo largo de gradientes ambientales?	59
¿Cómo opera el pastoreo sobre esta simbiosis y viceversa?.....	59
¿Cuál es el papel de la simbiosis en las estrategias de evasión y tolerancia a la herbivoría y en el compromiso entre ambas?	60
Perspectivas	60
Bibliografía.....	63

ÍNDICE DE CUADROS

Capítulo II

Cuadro 2. 1 Trabajos usados como base para los gradientes regionales y el análisis de importancia.....	11
Cuadro 2. 2 Resumen de los valores de importancia de las variables ambientales	15
Cuadro 2. 3 Los diez modelos de menor AICc generados para evaluar la importancia de las variables ambientales responsables de la distribución regional de la simbiosis..	15
Cuadro 2. 4 Relación entre la infección y las diferentes variables ambientales analizadas.	16
Cuadro 2. 5 Correlación de Pearson entre las variables usadas en el análisis.	16
Cuadro 2. 6 Ubicación de los sitios de muestreo de un gradiente de productividad primaria neta y precipitaciones.....	17
Cuadro 2. 7 Lista de gramíneas encontradas en los relevamientos.....	18
Cuadro 2. 8 Infección promedio, proporción de especies y número de especies en los 5 puntos de muestreo en situación de clausura y pastoreo.....	19
Cuadro 2. 9 Resultados del análisis de la variación de la infección en las poblaciones a lo largo de los gradientes ambientales y bajo distinto régimen de pastoreo (clausura o pastoreo).....	19

Capítulo III

Cuadro 3. 1 Especies de pastos de la comunidad en las que se encontraron endófitos del género <i>Epichloë</i> y en los que no, clasificados según su palatabilidad.....	27
Cuadro 3. 2 . Biomasa en gramos de la porción basal de los macollos de las especies con simbiosis <i>Epichloë</i> a lo largo del gradiente de pastoreo.	28

Capítulo IV

Cuadro 4. 1 Caracterización estructural de los parches de <i>L. multiflorum</i> con tres niveles de infección de simbiosis usados en el experimento de parches (alto, medio y bajo).....	36
Cuadro 4. 2 Caracterización estructural de la biomasa de <i>L. multiflorum</i> para las dos poblaciones analizadas (Lucero y Feliciano) con baja (~0%) y alta (~80%) infección.....	37
Cuadro 4. 3 Caracterización química de la biomasa de <i>L. multiflorum</i> ofrecida en el experimento de parches y en el de comederos (oferta simple) durante el estado reproductivo con niveles de infección de simbiosis alto (80%) y bajo (0%)	37

Capítulo VI

Cuadro 6. 1 Resultados del análisis de la varianza (ANOVA) para la relación tallo-raíz. ..	54
Cuadro 6. 2 Análisis de la producción de semillas en los tratamientos	54
Cuadro 6. 3 Número de semillas de plantas con y sin simbiosis en los diferentes tratamientos.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. 1 Ciclo reproductivo del hongo dentro de la planta. En azul se destaca la presencia del hongo durante cada etapa del ciclo del hospedante (semilla, plántula, vegetativo, reproductivo).	2
--	---

Capítulo II

Figura 2.1 Distribución de las poblaciones en los patrones regionales de infección de la simbiosis entre pastos templados y hongos del género <i>Epichloë</i> en relación a diferentes variables ambientales... ..	12
Figura 2.2 Relación entre las variables ambientales analizadas y la infección.....	16
Figura 2.3 Relación del nivel de infección en los diferentes regímenes de pastoreo.....	20
Figura 2.4 Nivel de infección para cada especie en situaciones de clausura y de pastoreo	201

Capítulo III

Figura 3. 1 Nivel de infección con endófitos del género <i>Epichloë</i> en dos especies preferidas y una no preferida, a lo largo del gradiente de pastoreo en la estepa semi-árida de la Patagonia (clausura, pastoreo moderado, pastoreo intenso).	28
--	----

Capítulo IV

Figura 4. 1 Diagrama y foto del experimento oferta+base.. ..	35
Figura 4. 2 Preferencia de los animales por parches de <i>L. multiflorum</i> con diferente nivel de infección de la simbiosis.	38
Figura 4. 3 Consumo por parte de los animales de las dos poblaciones de <i>L. multiflorum</i> (Lucero y Feliciano) con bajo (~0%) y alto (~80%) nivel de infección de simbiosis, durante los estados vegetativo y reproductivo.	39
Figura 4. 4 Consumo animal de la oferta de biomasa de <i>L. multiflorum</i> con bajo (~0%) y alto (~80%) nivel de infección en el experimento <i>base-oferta</i>	40

Capítulo V

Figura 5. 1 Variación del contenido hídrico del suelo para plantas con tratamiento de sequía.....	44
Figura 5. 2 Esquema del experimento de preferencia con plantas vivas.	45
Figura 5. 3 Esquema del experimento de preferencia con material cortado.	45
Figura 5. 4 Experimento en plantas vivas. Promedio de la proporción de áfidos por planta en los diferentes tratamientos.....	46
Figura 5. 5 Experimento en placas de Petri, con láminas cortadas. Promedio de la proporción de áfidos en una u otra lámina.	47

Capítulo VI

Figura 6. 1 Tamaño de efecto de los tratamientos (d) respecto al control para la tasa de crecimiento relativo en plantas asociadas o no con <i>Epichloë</i> y bajo distintas condiciones de crecimiento.	52
---	----

Figura 6. 2 Tamaño de efecto de los tratamientos (d) respecto al control para la biomasa aérea, de raíces y biomasa total.	53
Figura 6. 3 Tamaño de efecto de los tratamientos (d) respecto al control para la producción de semillas por planta en plantas asociadas o no con <i>Epichloë</i> cultivadas bajo distintas condiciones.	55
Figura 6. 4 Tamaño de efecto de los tratamientos (d) respecto al control para la proporción de biomasa reproductiva respecto del total de biomasa total (g) de plantas asociadas o no con <i>Epichloë</i> y cultivadas bajo distintas condiciones.	56

Capítulo VII

Figura 7. 1 Diagrama conceptual de la tesis donde estudiamos: primero, el efecto de factores abiótico sobre la simbiosis; Segundo, La interacción entre la simbiosis y la herbivoría; Tercero como los factores ambientales afectan a la interacción simbiosis herbivoría.	59
---	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Infección respecto a la latitud.....	75
Anexo 2 de correlación de Pearson de las variables usadas en el análisis de importancia y la latitud.	75
Anexo 3 Ejemplo de morfotipos aislados de <i>Epichloë</i> en diferentes especies de pastos a lo largo del gradiente.	76
Anexo 4 Relación tallo-raíz de las plantas con y sin simbiosis en los diferentes tratamientos en los 3 momentos de cosecha	77
Anexo 5 Biomasa aérea y de raíces de las plantas con y sin simbiosis en los diferentes tratamientos en los 3 momentos de cosecha.	78

ABREVIATURAS:

AIC	Criterio de información de Akaike (de sus siglas en ingles)
ANOVA	Análisis de varianza
<i>d</i>	Efecto de Cohen
DAP	Fosfato diamónico
E-	Plantas sin simbiosis con hongos del genero <i>Epichloë</i>
E+	Plantas con simbiosis con hongos del genero <i>Epichloë</i>
FDA	fibras en detergente ácido
FDN	Fibras en detergente neutro
IFEVA	Instituto de Investigación Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la
Agricultura	
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Log	Logaritmo
N	Nitrógeno total
NaOH	Hidróxido de Sodio
PPA	Precipitación Promedio Anual
PPN	Producción Primaria Neta
R ²	Coeficiente de determinación
TCR	Tasa de Crecimiento Relativa
TDR	Reflectómetro de dominio de tiempo (del inglés: Time Domain Reflectrometry)
VAR	Varianza
χ^2	Chi cuadrado

Resumen

Simbiosis pasto-hongo endófito: patrones regionales y su relación con los herbívoros

La simbiosis entre pastos templados y hongos endófitos sistémicos está difundida globalmente en diferentes ecosistemas. La frecuencia de infección del hongo en las poblaciones silvestres de pastos es muy variable y se piensa que altas infecciones podrían asociarse a un mejor desempeño de los pastos frente a la sequía y la herbivoría. Sin embargo, el desempeño de las plantas infectadas frente a estos factores ha sido principalmente evaluado en unas pocas especies de importancia agronómica. Además, la evidencia empírica acerca de patrones regionales de variación de la infección en poblaciones silvestres es muy escasa y no permite establecer el efecto de la simbiosis sobre las capacidades del hospedante para evadir o tolerar la herbivoría. Los objetivos de esta tesis fueron: comprender el papel del contexto ecológico sobre la infección del endófito y entender su efecto sobre la relación planta-herbívoro en distintas situaciones de disponibilidad hídrica. Se realizaron relevamientos a campo en los que se investigó la distribución regional de la simbiosis y los factores ambientales subyacentes, y experimentos manipulativos de herbivoría real y simulada en interacción con la disponibilidad de agua. Los estudios mostraron que (1) a lo largo de un gradiente ambiental regional la infección es menos favorecida en lugares con mayor aridez y la frecuencia de infección no cambia con el régimen de pastoreo, (2) en un pastizal semiárido, la palatabilidad de los pastos, en interacción con la toxicidad del endófito, determina el efecto final del pastoreo sobre la incidencia de la infección, (3) la infección con el endófito en una especie mesofítica (*Lolium multiflorum*) modifica la preferencia de ganado vacuno y, en menor medida, la de áfidos, (4) el endófito reduce levemente la capacidad del hospedante de tolerar la defoliación. Esta tesis brinda tres conclusiones principales: primero, la simbiosis pasto-hongo endófito es favorecida regionalmente en lugares con menor estrés ambiental. Segundo, la susceptibilidad al ambiente de la simbiosis como su efecto sobre los herbívoros es dependiente de la identidad del hospedante como la del herbívoro. Tercero, la capacidad defensiva que aporta la simbiosis está relacionada con estrategias de resistencia o evasión que tienen un aparente costo al reducir la capacidad de tolerar la herbivoría del hospedante.

Palabras Clave: simbiosis, pastos, herbivoría, sequía, *Epichloë*, endófitos, *Lolium multiflorum*.

Abstract

Grass-endophyte symbiosis: regional patterns and its relationship with herbivores.

Symbiosis between temperate grasses and systemic endophyte fungi is widespread in different ecosystems. Its frequency in wild populations is variable and high symbiosis frequencies may be associated to a better grass performance to drought and herbivory. Nevertheless, infected plant performance to these factors has been evaluated in few significant agronomic species. Moreover, empirical evidence including regional patterns of the symbiosis in wild populations is scarce and the effect of the symbiosis on plant responses to herbivory is also unclear. The objectives of this thesis are: to understand the effect of the ecological context on the symbiosis distribution and to understand the effect of the symbiosis in plant-herbivore relationship regarding different water-availability. We addressed these goals by mensurative studies analyzing symbiosis distribution across environmental gradients, and by manipulative experiments with actual and simulated herbivory. The studies showed that (1) endophyte infection is less favored in extreme ambient conditions (i.e. precipitation, elevation, grazing pressure), (2) plant palatability affects the grazing effect on endophyte incidence, (3) under specific circumstances, the endophyte modifies domestic and invertebrate herbivory, (4) the endophyte alters plant ability to tolerate herbivory. This thesis provides three main conclusions: First, the symbiosis is regionally favoured under less environmental stress (biotic and abiotic). Second, the symbiosis susceptibility to environmental conditions depends on both host and herbivore identities. The defense capacity provide by the symbiosis is based in resistance, but at the cost on the herbivore tolerance.

Key words: symbiosis, grasses, herbivory, drought, *Epichloë*, endophyte, *Lolium multiflorum*.

Capítulo I: Introducción general y objetivos de la tesis

Introducción:

Las gramíneas de crecimiento invierno-primaveral son centrales para la producción ganadera en pastizales templados (Blair 1997, Jacob et al. 2000), aunque entre un 20 y 30% de ellas establecen una relación con hongos endófitos del género *Epichloë* (Leuchtmann et al. 1992) que puede afectar severamente a los animales (Hoveland 1993). La relación que establecen con estos hongos involucra la producción de alcaloides, frecuentemente tóxicos, que pueden resultar letales para los animales. Si bien, los metabolitos fúngicos son muy variados y no siempre resultan tóxicos (Leuchtmann et al. 2000), se distinguen cuatro grupos principales con actividad tóxica para los herbívoros: las pirrolizidinas (lolininas), los ergots, los indoliterpenoides (lolitremas) y las pirrolopirazinas (peraminas) (Saikkonen et al. 2013). No obstante la importancia de los alcaloides fúngicos, ideas más recientes plantean que la simbiosis tiene un complejo efecto sistémico en los individuos afectando el metaboloma completo, lo que podría también afectar la preferencia de los herbívoros más allá de la producción de alcaloides fúngicos (Rasmussen et al. 2008, 2009, Dupont et al. 2015). Por ejemplo, algunos trabajos sugieren que la mayor incorporación de silicio de las plantas infectadas (Huitu et al. 2014) o la emisión de compuestos volátiles también pueden desalentar la herbivoría (García Parisi et al. 2014).

La importancia de esta simbiosis en sistemas productivos no se limita a la intoxicación del ganado doméstico sino que también se han documentado efectos del hongo sobre la capacidad de las plantas hospedantes para enfrentar otras situaciones de estrés como el ataque de invertebrados (Omacini et al. 2001, White et al. 2001, Saikkonen et al. 2010, Young et al. 2013), eventos de sequía (Gibert et al. 2012, Afkhami et al. 2014) y una habilidad competitiva mayor que la de sus congéneres no infectados por el hongo (Malinowski et al. 1997). La suma de los beneficios, o perjuicios, que aporta la simbiosis a la ecología del pasto hospedante no solo interesa desde el punto de vista del conocimiento sobre la ecología de comunidades (Rudgers et al. 2004, Rudgers y Clay 2007) sino que también ofrece un abanico de oportunidades para el desarrollo de nuevas tecnologías para el manejo de agroecosistemas. Aunque esta tesis no se concentrará directamente en estos aspectos, el manejo de esta simbiosis puede generar poblaciones de gramíneas con un mayor rango de distribución ambiental, con mayor tolerancia a la sequía, resistencia a pestes, etc. (Young et al. 2013).

Los hongos endófitos se alojan de forma sistémica entre los tejidos del hospedante (Carroll 1988). En esta tesis estudié, en particular, la simbiosis con hongos del género *Epichloë*, que pertenecen a los endófitos Clavicipitaceus de la clase 1, del tipo III (Clay y Shardl 2002, Rodríguez et al. 2009). Estos se asocian únicamente con pastos templados y por lo general establecen un mutualismo obligado con el hospedante, ya que la mayoría de las especies estudiadas de este grupo (Endófitos de la clase 1 tipo III, Rodríguez et al. 2009) presentan principalmente reproducción vertical (asexual) y tienen limitada la fase sexual. Entonces, a

diferencia de otros hongos dependen de su hospedante no solo para obtener carbono y nutrientes sino también para multiplicarse/transmitirse. La dispersión ocurre a través de la semilla de la planta hospedante, ya que el hongo se aloja en ella y, durante la fase vegetativa de crecimiento de la planta, permanece en la base de las láminas. Una vez que la planta inicia su fase reproductiva de crecimiento, el hongo crece junto con las varas florales, infecta las inflorescencias y las futuras semillas, que le permiten multiplicarse y transmitirse a la siguiente generación de plantas (Clay y Schardl 2002) (Figura 1.1). Debido a que esta transmisión no es perfecta, es decir que no todas las semillas serán colonizadas por el hongo, los niveles de infección entre distintas cohortes de plantas pueden variar (Gundel et al. 2011a, 2011b). Por lo tanto, la persistencia y aumento de la infección en una población dependerá del éxito reproductivo del hospedante con respecto a sus congéneres no simbióticos pero también de la eficiencia de la transmisión del hongo, que es variable en los distintos contextos ecológicos (Gundel et al. 2008).

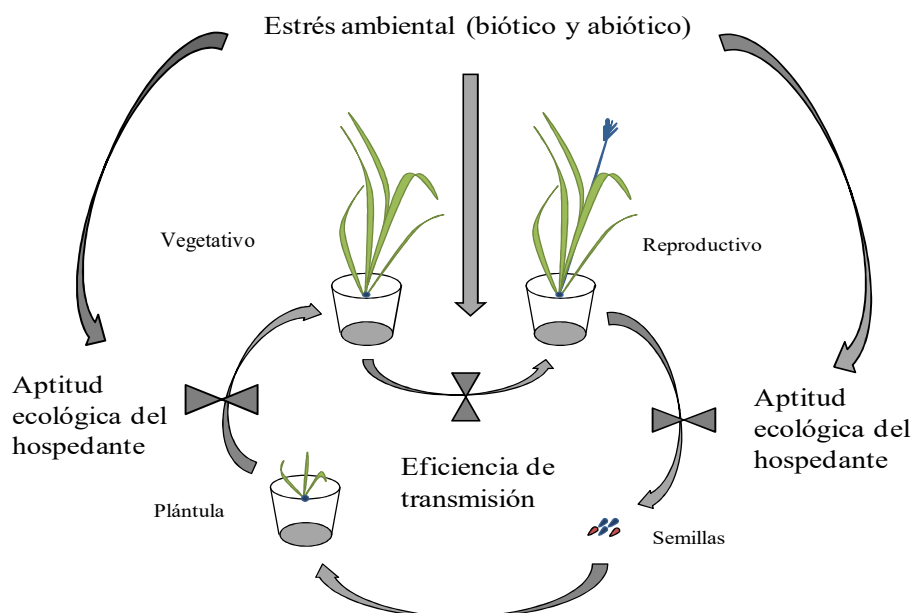


Figura 1. 1 Ciclo de una planta anual y su relación con el hongo endófito Clavicipitaceus, tipo III. En azul se destaca la presencia del hongo durante cada etapa del ciclo del hospedante (semilla, plántula, vegetativo, y reproductivo). Los lazos indican los dos momentos donde el contexto ambiental (biótico y abiótico) puede afectar el nivel de infección, modificando la eficiencia de transmisión o la aptitud ecológica del hospedante.

Relación de la simbiosis con el contexto abiótico y biótico

Si bien esta simbiosis está ampliamente difundida en la naturaleza, su incidencia en las poblaciones es extremadamente variable (Semmartin et al. 2015). Aunque se han detectado patrones regionales que permiten vislumbrar el control de ciertos factores ambientales sobre la frecuencia de infección en las poblaciones de pastos silvestres, la evidencia empírica revela una amplia variabilidad entre especies y entre poblaciones dentro de una misma especie (Lewis et al. 1997, Granath et al. 2007, Novas et al. 2007, Afkhami 2012, Gibert et al. 2012, Semmartin et al. 2015). Por ejemplo, la relación entre la incidencia del

endófito y la disponibilidad de agua arroja conclusiones contrastantes entre regiones (Lewis et al. 1997, Afkhami 2012, Gibert et al. 2012, Iannone et al. 2013, Semmartin et al. 2015) o bien entre especies dentro de una misma región (Novas et al. 2007). Mientras que en regiones mediterráneas se documentó la existencia de poblaciones con mayor proporción de plantas infectadas (frecuencia de infección) en los sitios más áridos (Lewis et al. 1997, Gibert et al. 2012), otro estudio que abarcó un gradiente ambiental más amplio reveló que la frecuencia de infección de las poblaciones aumenta con las precipitaciones promedio del sitio (Semmartin et al. 2015). Si bien la presencia del endófito puede aumentar la tolerancia a la sequía (Hesse et al. 2002, 2005, Hahn et al. 2008), la discrepancia señalada entre estudios podría deberse a que en las regiones húmedas, pero con sequía estival (e.g. ambientes mediterráneos), la simbiosis podría favorecerse por aumentar la supervivencia de sus hospedantes durante un período acotado de sequía. En cambio, en regiones en las que el clima general es árido, la limitación permanente por agua contrarrestaría la eventual ventaja del endófito y su frecuencia disminuiría por la condición de sequía prácticamente permanente (Semmartin et al. 2015).

Otra explicación a la inconsistencia en los resultados entre algunos estudios regionales podría residir en la interacción de la aridez con la presión de herbivoría, uno de los factores más relevantes en la literatura como promotores de la simbiosis (Clay et al. 2005, Saikkonen et al. 2010). A lo largo de gradientes de precipitación (y productividad primaria) creciente, también hay un aumento más que proporcional de la intensidad de la herbivoría potencial (McNaughton et al. 1989, Oesterheld et al. 1992, 1998) que podría modificar el patrón esperable si solo se considera la aridez como fuerza selectiva de la simbiosis. La presión de herbivoría favorecería a los individuos infectados con respecto a los no infectados, en virtud de la protección anti-herbívoro que confiere el endófito. En este sentido, la mayor incidencia de la simbiosis en sitios más húmedos y productivos, encontrada recientemente (Semmartin et al. 2015) sugiere que la defensa anti-herbívoro también podría jugar un papel importante en la abundancia y distribución regional de la simbiosis (Bazely et al. 1997, Granath et al. 2007, Koh y Hik 2007). Aunque no existan evidencias firmes de que el efecto de defensa anti-herbívoro del endófito sea una generalidad en sistemas naturales (Saikkonen et al. 1998, 2010, Faeth 2002), ni de su efectividad frente a los herbívoros vertebrados, este mecanismo cuenta con un fuerte sustento en especies de uso doméstico (Clay 1996, Bazely et al. 1997, Saikkonen et al. 2004, Gundel et al. 2013) y para herbívoros invertebrados (Tibbets y Faeth 1999, Brem y Leuchtman 2001, Miranda et al. 2011). No obstante, las evidencias en poblaciones silvestres de pastos (no domesticados) y sus efectos sobre herbívoros domésticos es mucho más limitada (Bazely et al. 1997, Granath et al. 2007, Koh y Hik 2007, Rudgers et al. 2016).

La presión de la herbivoría doméstica en los sistemas templados supera en varios órdenes de magnitud a la herbivoría natural (Oesterheld et al. 1992) ejerciendo, por lo tanto, una fuerte presión selectiva sobre los pastos. De este modo, los ajustes en los costos y las estrategias defensivas de las plantas responderían a la herbivoría doméstica. Si bien está claramente establecido que la principal defensa que confiere el endófito se basa en la producción de alcaloides tóxicos (Bacon et al. 1977, Fletcher y Harvey 1981, Porter et al. 1981, Fletcher 1999, Schardl et al. 2012, Young et al. 2013), esta idea podría estar muy influenciada por las especies y sistemas estudiados, en su mayoría con importancia

forrajera y con alta producción de alcaloides clínicamente tóxicos para el ganado. La toxicidad contra vertebrados no parece ser una estrategia generalizada en sistemas naturales donde estas simbiosis tóxicas han sido poco documentadas (Saikkonen et al. 1998, Faeth y Bultman 2002, Faeth 2002, Iannone et al. 2011), lo que lleva a considerar el papel de otros mecanismos mediante los cuales la simbiosis podría contribuir a la capacidad de las plantas para defenderse de los herbívoros, como los mecanismos compensatorios frente a la remoción de tejido fotosintético (Oosterheld y McNaughton 1991).

Los modelos de defensa anti-herbivoría más aceptados plantean que las plantas poseen alguna de las dos estrategias principales, la de tolerancia o la de evasión (Agrawal et al. 1999, Stowe et al. 2000). En la tolerancia prima el crecimiento compensatorio para restituir el tejido fotosintético removido por el herbívoro o la relocalización de los recursos dentro de la planta que reducen el efecto negativo de la pérdida de tejido (Oosterheld y McNaughton 1991). En las de evasión, se evita la pérdida de área foliar desalentando el consumo. Ambas estrategias suponen un compromiso entre crecer y defenderse debido a que la inversión metabólica en generar la defensa (e.g. alcaloides, lignina, látex) compite por el uso alternativo para el crecimiento. A su vez, contextos ecológicos contrastantes seleccionarían una u otra estrategia, en lugares con poca disponibilidad de recursos se daría especies de crecimiento más lento con alta inversión en defensas donde primarían estrategias de evasión. Por el contrario, en ambientes con alta disponibilidad de recursos, primarían estrategias de tolerancia relacionada con poca inversión en defensa y un crecimiento más rápido (Coley et al. 1985). En este contexto, la simbiosis entre pastos y hongos endófitos plantea una situación particular ya que parece desactivar la aparente dicotomía entre las dos estrategias anti-herbívoro. Por un lado, desalentaría el consumo (evasión) mientras que por el otro podría aumentar la capacidad competitiva de la planta (mayor crecimiento o producción de semillas) frente a la defoliación (tolerancia). Esta situación, no obstante, no está del todo comprendida y la evidencia empírica es muy limitada (Belesky y Fedders 1996, Malinowski et al. 1997, Cheplick 1998).

El estudio en ambientes naturales puede contribuir a comprender los factores ambientales y las interacciones subyacentes a la distribución geográfica y al mantenimiento de la simbiosis (Faeth 2002, Saikkonen et al. 2004, 2006, Kannadan y Rudgers 2008, Iannone et al. 2011). Una hipótesis, aún no contrastada, plantea que en la naturaleza esta asociación se mueve a lo largo de un continuo oscilando entre mutualismo y parasitismo (Saikkonen et al. 1998). Es decir, que los factores abióticos (e.g. disponibilidad hídrica, de nutrientes), los bióticos (e.g., herbivoría, enfermedades, parásitos), y sus interacciones, determinarían el efecto neto del hongo sobre su hospedante afectando la incidencia de la simbiosis en la población de pastos (Krauss y Müller 2005). De esta manera, se esperaría que en sitios donde el hongo se comporte como parásito la infección fuera baja mientras que en los que se comporte como mutualista fuera mayor (Saikkonen et al. 1998, Gundel et al. 2008). Esta predicción basada en modelos de costo-beneficio y compromisos en la asignación de los recursos no siempre se ajusta a la evidencia empírica donde el costo de la simbiosis parece sobrecompensada por los beneficios, describiéndose en algunas especies un aumento de la capacidad competitiva de las plantas con simbiosis con respecto a las que no la presentan (Malinowski et al. 1997).

Objetivos, hipótesis y predicciones

En esta tesis se estudian los dos factores más relevantes, sequía y herbivoría, planteados como críticos en determinar el papel ecológico de esta simbiosis en los pastos templados. Se abordaron interrogantes que hasta el momento no han encontrado respuestas satisfactorias. *¿Cómo es la distribución de la simbiosis en poblaciones silvestres a lo largo de gradientes ambientales? ¿Cómo influye el pastoreo sobre esta simbiosis y viceversa? ¿Cuál es el papel de la simbiosis en las estrategias de evasión y tolerancia a la herbivoría? ¿Existe un compromiso entre ambas?* Para poder responder estas preguntas, planteo dos objetivos principales con una serie de objetivos específicos:

1) El primer objetivo principal es comprender la influencia del contexto ecológico, abiótico y biótico, sobre el mantenimiento de la simbiosis.

a) En primer lugar, analizamos los patrones regionales de la simbiosis en relación con variables ambientales (precipitación anual promedio, temperatura anual promedio, altitud y productividad primaria anual promedio) y evaluamos la importancia relativa de cada una de ellas.

I. Hipótesis: El patrón de infección de la simbiosis variará a lo largo del gradiente de precipitaciones y de productividad primaria debido a la interacción de las capacidades de tolerancia a la sequía y de resistencia a herbivoría que aporta la simbiosis.

II. Predicciones: Esperamos encontrar una relación positiva entre el nivel de incidencia del endófito, las precipitaciones y la productividad primaria, es decir, un aumento en la incidencia en lugares con menor estrés ambiental y mayor carga de herbivoría potencial.

b) En segundo lugar, evaluamos el papel de la herbivoría doméstica sobre la simbiosis mediante el análisis de situaciones contrastantes (pastoreo y clausura) a lo largo del mismo gradiente regional abordado en el primer objetivo.

I. Hipótesis: La frecuencia de infección de las poblaciones variará entre los contextos de clausura y pastoreo por el efecto de la herbivoría local y la por la defensa relativa contra herbivoría que aporta la simbiosis, que puede modificar la dinámica competitiva entre plantas que presentan o no esta asociación.

II. Predicciones: Esperamos encontrar una mayor incidencia del endófito en lugares con pastoreo que en sus pares no pastoreados en lugares donde la defensa relativa que aporte la simbiosis sea mayor (ej. lugares más productivos).

c) En tercer lugar, estudiamos el efecto de la variación en la intensidad de la herbivoría sobre la incidencia de la simbiosis en gramíneas que presentan distinta preferencia por parte de los herbívoros.

- I. Hipótesis: El pastoreo afecta la frecuencia de infección modificando la capacidad competitiva del hospedante. Por lo tanto, la frecuencia de la infección dependerá de la carga de herbivoría y la preferencia del ganado sobre el hospedante.
- II. Predicciones: Esperamos encontrar que el pastoreo afecte de forma unimodal a la frecuencia de infección a medida que varía la carga de herbivoría, y esta variación en la frecuencia de infección se verá acompañada por una variación similar en la biomasa del hospedante. Esperamos que este efecto sea más evidente en las especies más preferidas.

2) El segundo objetivo principal es estudiar el papel de la simbiosis con los herbívoros mediante su modificación de las capacidades defensivas de las plantas.

- a) En primer lugar, estudiamos el impacto de la simbiosis sobre la herbivoría doméstica (*Bos taurus*), en un caso en el que la simbiosis no presenta síntesis de alcaloides clínicamente tóxicos para el ganado. Se estudiaron los efectos mediados por cambios nutricionales, morfológicos y metabólicos de las plantas hospedantes.
 - I. Hipótesis: El efecto de la simbiosis sobre la preferencia del herbívoro doméstico por *Lolium multiflorum* está mediado por cambios en la composición nutricional, estructural y química.
 - II. Predicciones: Esperamos encontrar una mayor preferencia por las plantas sin endófitos, y que esta mayor preferencia se asociará a mayor contenido de proteína y menor contenido de lignina.
- b) En segundo lugar, analizamos el papel de la simbiosis en desalentar el consumo en herbívoros invertebrados y como promotora de respuestas compensatorias a la defoliación bajo distintos contextos de disponibilidad hídrica.
 - I. Hipótesis: (Ia) La preferencia sobre plantas de *Lolium multiflorum* variará por la presencia del endófito y por su interacción con el contexto ambiental (sequía y defoliación). (Ib) La simbiosis modificará la respuesta de la planta hospedante a la defoliación. El endófito compite por recursos con el hospedante por lo que limita la recuperación del tejido luego de la defoliación. Sin embargo, esta competencia se podría reducirse en situaciones de sequía debido a los efectos mitigadores del endófito frente a este estrés.
 - II. Predicciones: (Ia) Los áfidos preferirán plantas sin endófitos en relación con las infectadas. Sin embargo, el estrés por sequía produce cambios fisiológicos más generales que diluyen esta preferencia. (Ib) Las plantas con endófitos presentarán un menor crecimiento luego de la defoliación que las plantas sin endófitos. Sin embargo, esta diferencia desaparecerá en plantas sometidas a sequía.

Organización de la tesis

La tesis se organizó a partir de los objetivos presentados más arriba. Este primer capítulo describió el estado del conocimiento y plantea las preguntas y objetivos que se pretenden responder. El capítulo II describe la relación entre las variables ambientales y la simbiosis, además define la importancia relativa de cada una de estas variables ambientales para explicar la distribución de la simbiosis y cómo estos patrones pueden verse afectados por el pastoreo (primer objetivo general). El capítulo III, también alineado con el primer objetivo general, estudia el efecto de diferentes intensidades de pastoreo sobre especies de pastos con simbiosis en relación a la palatabilidad del hospedante. El capítulo IV inicia el abordaje del segundo objetivo general, y estudia las eventuales capacidades defensivas que puede otorgar la simbiosis contra la herbivoría doméstica. El capítulo V estudia la eventual capacidad defensiva (resistencia) a la herbivoría por invertebrados que aporta la simbiosis y cómo varía frente a la sequía. El Capítulo VI evalúa si la simbiosis modifica la tolerancia de las plantas a la herbivoría y si la tolerancia varía con la sequía. Finalmente, el capítulo VII contiene las conclusiones y analiza la contribución general de esta tesis al conocimiento. En él se exponen las perspectivas de los estudios que se vislumbran a partir de los resultados obtenidos, necesarios para continuar profundizando nuestra comprensión acerca de la ecología de esta interacción entre pastos, hongos y herbívoros.

Cada uno de los capítulos experimentales (II, III, IV, V, VI) presenta secciones propias de introducción, métodos, resultados y discusión. De esta manera cada capítulo introduce sus marcos conceptuales específicos, análisis y conclusiones, donde en ocasiones se hace referencia a los capítulos previos de forma tal que se construyen las conclusiones integradoras expuestas en el capítulo VII.

Capítulo II: Patrones regionales de la simbiosis a lo largo de gradientes ambientales

Introducción

La simbiosis entre endofitos del género *Epichloë* y gramíneas C₃, globalmente distribuida en pastizales templados, presenta una notable variabilidad en la magnitud de su incidencia (frecuencia de infección) (Semmartin et al. 2015). Si bien se propone que la sequía (Lewis 1997, Afkhami 2012, Gibert et al. 2012) y la herbivoría (Clay 1996, Schardl 2010) serían determinantes clave de su nivel (nivel de infección como proporción de plantas de una población que presenta la asociación), la evidencia empírica disponible es escasa y contradictoria.

La resistencia contra la sequía es uno de los factores más estudiados como responsable de la distribución geográfica de la simbiosis (Lewis 1997, Novas et al. 2007, Afkhami 2012, Gibert et al. 2012, Semmartin et al. 2015). Sin embargo, estos estudios muestran resultados frecuentemente contrastantes y suelen limitarse a una región ambiental o a unas pocas especies. Por ejemplo, trabajos realizados con especies perennes (*Lolium* spp.) en Francia sugieren que la simbiosis confiere tolerancia a la sequía. En estos trabajos se describen mayores niveles de infección en las localidades lugares más secas (Lewis et al. 1997, Gibert et al. 2012). Por otro lado, trabajos que incorporaron al análisis un mayor número de especies y de regiones climáticas muestran una relación opuesta con menor infección en las regiones más áridas (Novas et al. 2007, Afkhami 2012, Semmartin et al. 2015). Estos resultados, junto con los obtenidos en experimentos bajo condiciones controladas que también exhiben una notable variabilidad entre especies y ecotipos (Saikkonen et al. 2016, Helander et al. 2016), sugieren que la tolerancia de la simbiosis a la sequía no es algo generalizado y que parece depender del contexto y/o del hospedante.

El papel de la herbivoría como determinante del éxito ecológico y mantenimiento de la simbiosis también se ha abordado en distintos sistemas con resultados más consistentes (Bazely et al. 1997, Granath et al. 2007, Koh y Hik 2007, Rudgers et al. 2016). Un estudio con poblaciones silvestres bajo pastoreo de ovejas, también silvestres, en islas escocesas documentó una relación positiva entre la presión de la herbivoría y el aumento de la simbiosis (Bazely et al. 1997). Otro estudio en sistemas naturales, en Escandinavia, con renos reveló efectos similares en *Festuca rubra* aunque no se detectaron cambios en la incidencia del endófito en *Festuca ovina* (Granath et al. 2007). Los estudios de (Koh y Hik (2007) en Canadá mostraron un patrón similar frente a la herbivoría de un mamífero de porte pequeño, al igual que los hallazgos recientes de Rudgers y colaboradores (2016) en sistemas pastoreados por ganado doméstico. Estos resultados consistentes en diferentes sistemas sugieren que, a pesar de la posible variación en importancia entre especies, la herbivoría podría promover la infección y el mantenimiento de la simbiosis.

En un análisis sobre la relación entre la frecuencia de infección del endófito en sistemas naturales y seminaturales (estos últimos con mínimo manejo agronómico), encontramos

que el nivel de infección promedio de la simbiosis era mayor en los sitios más productivos (Semmartin et al. 2015). A su vez, los ambientes con mayor disponibilidad de recursos experimentan una mayor intensidad de herbivoría promedio (McNaughton et al. 1989, Oosterheld et al. 1992, 1998). No obstante, en este estudio no pudimos establecer un análisis que nos permitiera cuantificar la intensidad de la herbivoría ni su impacto en la distribución geográfica del endófito, ya que los estudios incluidos rara vez consignaban el tipo o la intensidad de herbivoría.

En el caso particular de ecosistemas templados de Sudamérica, una serie de trabajos también ha descrito la variabilidad de la infección del endófito en distintas poblaciones e indagado sobre sus causas. Los estudios desarrollados por Iannone y colaboradores (2013) revelaron que la salinidad del suelo se asocia a una menor infección. En paisajes ubicados en latitudes más australes de la estepa patagónica, Novas y colaboradores (2007) encontraron una relación variable entre la infección y el estrés hídrico, negativa para *Phleum alpinum* pero positiva para *Bromus setifolius*, similar a la observada para *Hordeum comosum* (Iannone et al. 2015). En pastizales templados y subhúmedos de la pampa deprimida, Gundel y colaboradores (2009) analizaron la incidencia de la simbiosis en dos especies exóticas (*Lolium multiflorum* y *Schedonorus arundinaceus*) en distintos ambientes del paisaje y bajo contextos de pastoreo continuo y de clausura. Encontraron altos niveles de infección y que apenas variaron con el pastoreo en el caso de *L. multiflorum*. Los antecedentes aquí revisados ofrecen una buena descripción de la simbiosis en distintos contextos pero no permiten generalizar acerca de los controles regionales, ya sea por centrarse en un paisaje acotado espacialmente o bien por restringirse a un reducido número de especies.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la importancia relativa de distintas variables ambientales como determinantes del nivel de incidencia de la simbiosis en poblaciones silvestres de gramíneas templadas a lo largo de un gradiente ambiental regional amplio y evaluar el efecto del pastoreo sobre la incidencia de la simbiosis en este mismo gradiente. Para lograr este objetivo realizamos dos estudios: primero, analizamos la relación de diferentes variables ambientales con la incidencia del endófito en poblaciones de pastos distribuidos a lo largo de un gradiente regional de la Argentina (utilizando datos publicados y datos propios); la hipótesis de trabajo propone que la frecuencia de la simbiosis en las poblaciones silvestres de gramíneas templadas sometidas a pastoreo doméstico y silvestre a lo largo de un gradiente de disponibilidad de agua y de productividad variará en función del estrés ambiental. Esperamos encontrar una relación positiva entre la frecuencia de infección del endófito, las precipitaciones y la productividad primaria, es decir un aumento en la incidencia en lugares con menor estrés ambiental y mayor carga de herbivoría (potencial).

En el segundo estudio analizamos, mediante muestreos en el campo de situaciones pastoreadas y clausuradas al pastoreo, si el patrón de distribución regional cambia en función del régimen de pastoreo. La hipótesis propone que la infección será mayor que en los sitios sin pastoreo, particularmente en el extremo más productivo del gradiente ambiental. En este extremo, el endófito conferiría una mayor ventaja frente a la creciente intensidad de herbivoría en relación con el extremo menos productivo y con menor carga de herbivoría.

Metodología

Para contestar este objetivo se obtuvo los niveles de infección del endófito (proporción de plantas en una población que presentan la asociación con *Epichloë*) a partir de dos tipos de fuentes: por un lado se analizó el subconjunto de estudios publicados para la región (171 poblaciones silvestres correspondientes a 11 especies de pastos templados, Cuadro 2.1), que habían sido incluidos en Semmartin et al. (2015) y por otro lado se utilizó información de relevamientos propios en 5 sistemas pastoriles que abarcan desde el paralelo 45°S, en la provincia de Chubut hasta el paralelo 31°, en la provincia de Córdoba (ver metodología de recolección más abajo).

Los sitios de origen de cada dato se geo-referenciaron y se estimaron los valores anuales promedio de temperatura, precipitaciones, altitud y productividad primaria de cada uno mediante el programa Qgis. La temperatura, la precipitación y altitud se estimaron a partir de bases de datos de imágenes alta resolución espacial generadas a partir de compilaciones de datos provenientes de estaciones meteorológicas (Hijmans 2005). Se utilizó la base de datos Worldclim, específicamente la que contiene datos a una resolución espacial de 1 km². Esta base de datos integra información de 50 años (1950-2000) e incorpora información de estaciones meteorológicas que al menos presentan 10 años continuos de mediciones (<http://www.worldclim.org>). La productividad primaria neta aérea se obtuvo a partir de imágenes satelitales de resolución moderada (1km²) (MOD17A3) (Zhao et al. 2005) que estiman la productividad a través del Índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI), para lo cual usamos los datos de 7 años (200-2006) donde promediamos los píxeles que se encontraban a 1km alrededor de cada población.

Obtención de los datos

La información de los estudios publicados provenía de relevamientos que cumplían los siguientes requisitos: i) se habían realizado en Argentina; ii) el trabajo presentaba información cuantitativa sobre la infección de simbiosis (se usaron los viejos términos para referirse a *Epichloë*: *Acremonium* y *Neotyphodium*) de las poblaciones y precisaba el sitio de recolección de las muestras; iii) los datos se habían tomado a campo y correspondían a vegetación natural o seminatural, se consideró que una población era natural cuando no había indicios de que fueran pasturas implantadas (Cuadro 2.1).

Cuadro 2. 1 Trabajos publicados + datos de esta tesis incluidos en el estudio de gradiente ambiental. En total se obtuvieron 181 poblaciones correspondientes a 11 especies. La especie de endofito hace referencia a la especie de endófito comunicada en el manuscrito original y en paréntesis especie frecuente con la que se describe asociación.

Autor	Año	Revista	Especie de pasto	Especie de endófito	Número de poblaciones
Gundel et al.	2009	Microbial Ecology	<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë oculmans</i> (<i>Epichloë tembladera*</i>)	12
			<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Epichloë oculmans</i>	40
Iannone et al.	2009	Mycologia	<i>Bromus auleticus</i>	<i>Epichloë pampeanum</i>	23
Iannone et al.	2011	Mycol Progress	<i>Bromus auleticus</i>	<i>Epichloë pampeanum</i>	9
			<i>Festuca hieronymi</i>	<i>Epichloë tembladera*</i>	1
			<i>Poa bonariensis</i>	<i>Epichloë sp.</i>	2
			<i>Poa durifolia</i>	<i>Epichloë sp.</i>	1
			<i>Poa huecu</i>	<i>Epichloë tembladera*</i>	1
			<i>Poa lanuginosa</i>	<i>Epichloë sp.</i>	2
			<i>Bromus setifolius</i>	<i>Epichloë sp.</i>	36
Novas et al.	2007	FEMS Microbial Ecol	<i>Phleum alpinum</i>	<i>Epichloë sp.</i> (<i>Epichloë tembladera*</i> Iannone et al 2011)	28
			<i>Poa spiciformis</i>	<i>Epichloë sp.</i>	15
			<i>Bromus brachyanthera</i>	<i>Epichloë sp.</i>	1
Hernández-Agramonte	2015	Esta tesis	<i>Bromus setifolius</i>	<i>Epichloë sp.</i> (<i>Epichloë tembladera*</i> Iannone et al 2011)	1
	2013		<i>Festuca hieronymi</i>	<i>Epichloë sp.</i> (<i>Epichloë tembladera*</i> , Iannone et al 2011)	1
	2012		<i>Festuca argentina</i>	<i>Epichloë sp.</i> (<i>Epichloë tembladera*</i> Iannone et al 2011*)	1
	2015		<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë sp.</i> (<i>Epichloë tembladera*/Epichloë oculmans*</i>)	1
	2013		<i>Festuca circinata</i>	<i>Epichloë sp.</i>	1
	2012		<i>Hordeum comosum</i>	<i>Epichloë sp.</i> (<i>Epichloë tembladera*</i> Iannone et al 2014)	1
	2015		<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Epichloë oculmans</i>	2
	2015		<i>Poa lanigera</i>	<i>Epichloë sp.</i>	1
	2012		<i>Poa lanuginosa</i>	<i>Epichloë sp.</i>	1
	2013		<i>Poa stuckertii</i>	<i>Epichloë sp.</i>	1

La información proveniente de relevamientos propios de esta tesis incluyó 5 sistemas (sitio 1, 2, 3, 4, 5) ubicados a lo largo de un rango de 13 grados de latitud y de un gradiente de precipitaciones anuales promedio entre 70 y 1200 mm. En cada sitio se obtuvo una muestra de la población de pastos C3 (hospedantes potenciales del endófito) de la comunidad en situaciones de clausura para herbivoría domestica y pastoreo (Figura 2.1).

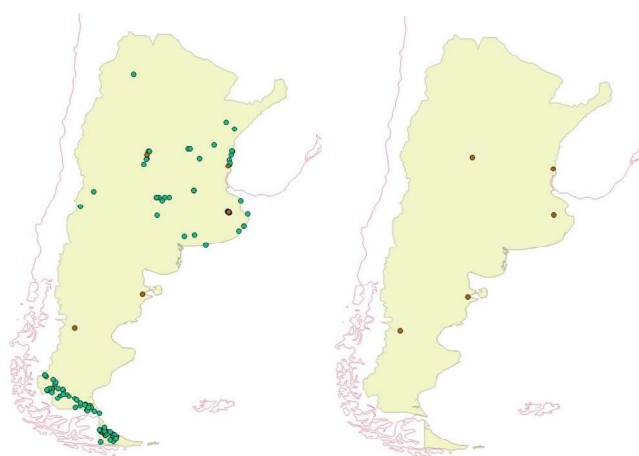


Figura 2.1 Distribución de las poblaciones usadas para describir los patrones regionales de infección de la simbiosis entre pastos templados y endofitos del género *Epichloë* en relación a diferentes variables ambientales. A la Izquierda, la distribución de las poblaciones obtenidas en la literatura mas las muestreadas a campo. A la derecha los lugares muestreados a campo usados para estudiar la variación de esta relación en situaciones de pastoreo y clausura.

Sitio 1, estepa patagónica (Región patagonica, distrito occidental): este sitio representa el extremo más árido y austral del gradiente muestreado. El muestreo se realizó en la estación experimental del INTA, localizada al sudoeste de la provincia de Chubut, Argentina (45° 24" S, 70° 15" O). Este ambiente se caracteriza por presentar precipitaciones con un promedio anual de 137 mm (Fernández et al. 1991), principalmente durante el otoño e invierno (Sala et al. 1989), y las temperaturas medias mensuales varían de 2°C en el mes de julio (invierno) y 14°C en enero (verano). La vegetación corresponde a la definida para el distrito fitogeográfico occidental, que es una estepa arbustivo-graminosa (León et al. 1998) con una cobertura vegetal del 50% del suelo. La riqueza florística es de 25 especies (7 gramíneas, 3 arbustos, 10 hierbas perennes, 5 hierbas anuales). La cobertura en lugares con poco pastoreo está dominada por pastos (30-48%), arbustos (15%) y finalmente las hierbas perennes y anuales (2% y 1% de cobertura respectivamente) (Golluscio et al. 1982). La estación experimental presenta una carga de pastoreo moderado, 0,2 EO/ha (EO: equivalente oveja) (Oñatibia et al. 2015) y cuenta con 3 clausuras, construidas en 1954, 1972 y 1983 para la exclusión de herbívoros domésticos.

Sitio 2, estepa patagónica (Región patagonica, distrito del Golfo de San Jorge): este sitio se encuentra situado al noroeste de la provincia de Chubut (42°44'S, 65°07'O y 42°08'16,10" S y 64°57'48,37" O). Las precipitaciones promedio anuales son de 235,9 mm y también ocurren principalmente durante otoño e invierno. La temperatura media anual es de 13,7 °C. La vegetación corresponde al distrito fitogeográfico del monte

patagónico dominado por *Larrea divacata* y *Stipa* spp. (León et al. 1998). La cobertura vegetal promedia el 40% y existen dos grupos funcionales dominantes: arbustos y pastos. Estos últimos representados principalmente por *Stipa tenuis*, *Pappostipa speciosa* y *Poa ligularis* (Bisigato y Bertiller 1997). La carga normal de la zona ronda entre 0,17-0,2 EO/ha (EO: equivalente oveja) (Pazos et al. 2007). En este punto del gradiente contamos con tres áreas de pastoreo (ovejas) y tres de clausura, en la que solo se registra pastoreo de guanacos (reservas San Pablo y La Esperanza).

Sitio 3, Pampa Deprimida (Región pampeana, Distrito Pampeano Occidental): El sitio de muestreo se ubica en una estancia privada (establecimiento Las Chilcas) en la localidad de Pila, provincia de Buenos Aires (36° 30' S, 58° 30' O). El clima es subhúmedo con temperaturas medias de 7°C en invierno y 22°C en verano, y precipitaciones anuales promedio están entre 850 mm y 990 mm, distribuidas uniformemente durante todo el año. La vegetación es una pradera mesofítica que presenta una heterogeneidad espacial asociada a pequeñas variaciones topográficas y de salinidad (Perelman et al. 2001). Las clausuras donde se realizó el estudio fueron instaladas hace 27 y 33 años respectivamente y las zonas adyacentes han sido manejadas históricamente para la ganadería con cargas bajas a moderadas, que oscilan los 0,5-1 Equivalente-animal/ha.

Sitio 4, Chaco Serrano (Región Chaqueña, Distrito Chaqueño Occidental serrano): el lugar de muestreo se encuentra en el Parque Nacional de la Quebrada del Condorito, provincia de Córdoba (31°60'S y 65° 50'O), a una altitud aproximada de 2000 m.s.n.m. Con temperaturas en verano que oscilan entre los 15 y 8°C y en invierno entre 8 y 2°C (Cabido et al. 1997). El área presenta precipitaciones anuales promedio de 950 mm, concentradas principalmente en los meses de octubre y abril (Cabido et al. 1985). La vegetación corresponde a un pastizal de altura que se caracteriza por un cambio en los tipos funcionales y en la dominancia de pastos C₄ a C₃ según la altitud, dominando casi exclusivamente las C₃ a partir de los 1900 metros. Se muestrearon 3 clausuras de aproximadamente 3 años y 3 lotes adyacentes como área pastoreada.

Sitio 5, Pampa húmeda (Región pampeana, Distrito Pampeano Uruguayense): Este sitio representa el extremo más húmedo, cálido y productivo de nuestro gradiente (58°21'11"S, 32° 30'16"O). El muestreo se realizó en la estación experimental del INTA de Concepción del Uruguay, situada en la provincia de Entre Ríos (Argentina), en la región de la Pampa ondulada. Con temperaturas promedio de 18°C y precipitaciones promedio anuales de 1200mm. La vegetación era históricamente pastizales utilizados para la agricultura, dominado por gramíneas C₄ y C₃, pero este paisaje se ha modificado durante las últimas dos décadas debido al avance de la agricultura (Baldi et al. 2006). En este punto del gradiente se conto con una clausura de aproximadamente 3 años de antigüedad, y que presentaba un lote adyacente con pastoreo, de un tamaño similar a la clausura.

De los sitios pareados seleccionados, con y sin pastoreo, en cada punto del gradiente se recolectaron muestras usando transectos alejados al menos 30 m de un camino y se evitó muestrear cerca de los alambrados o bebederos para evitar las zonas de alta actividad del ganado. Siempre que fue posible se muestreó al menos 20 individuos de cada población en estado reproductivo de las gramíneas dominantes, cada planta recolectada estuvo a una distancia mínima entre individuos de 2 m para evitar muestrear al mismo individuo dos veces. De cada ejemplar se tomaron 20 macollos reproductivos o vegetativos que se conservaron en bolsas plásticas a 5°C hasta la determinación, en laboratorio, de la presencia

o ausencia del endófito (Iannone et al. 2011). En los macollos se examinó la porción verde, basal y, siempre que fue posible, se examinó en semillas para determinar la presencia o no del endófito, en algún caso concreto para confirmar la infección con *Epichloë* se aisló el endófito.

La determinación de la presencia del endófito en el meristema del tallo y/o semilla se realizó mediante la observación con microscopio. Cada muestra de tallo y semilla fue tratada con NaOH y teñida con rosa de bengala (Bacon y White 1994a, 1994b). Además, para los puntos de muestreo en la Pampa deprimida y Pampa húmeda se realizó aislamiento en placa de Petri del endófito en algunas especies para corroborar infección con *Epichloë*, aunque no se describieron morfotipos ni se determinó la especie del endófito ya que no era el objetivo de este estudio. Para el aislamiento se usó Agar papa glucosado, y se mantuvieron en oscuridad a 23°C. Previo al cultivo el material vegetal fue desinfectado con baños en alcohol (etanol 70%) durante un minuto y lavandina comercial (hipoclorito de sodio 2-3%) durante 15 min (basado en Iannone et al. 2010). En cada sitio se estimó la cantidad de especies que presentaron la simbiosis como una proporción del total de especies de gramíneas templadas de ese sitio (candidatas potenciales a establecer la simbiosis con el endófito). En el subconjunto de especies que presentaron la simbiosis se estimó la infección como la proporción de individuos infectados del total de ejemplares observados de esa población (White et al. 2001, Novas et al. 2007, Gundel et al. 2008).

Para estimar el efecto de las diferentes variables en situaciones de pastoreo y clausura se utilizaron dos variables. A nivel poblacional se utilizó la infección y a nivel de comunidad se usó la proporción de especies con simbiosis de todas las especies muestreadas. Ambas variables se estimaron para cada punto de muestreo y para las dos situaciones de clausura y pastoreo.

Análisis estadísticos

En función de los objetivos planteados, realizamos dos análisis independientes: por un lado, a partir de los datos recopilados en estudios publicados y la porción de datos propios 1 bajo pastoreo de los 5 sistemas relevados en esta tesis, analizamos el papel relativo de cada variable ambiental como determinante de la incidencia de la simbiosis. Por otro lado, para analizar el efecto del pastoreo sobre la incidencia de la simbiosis a lo largo de un gradiente ambiental, utilizamos exclusivamente los datos en pastoreo y clausura de los 5 relevamientos de esta tesis.

El análisis de la importancia relativa de cada variable se realizó mediante modelos de inferencia del paquete MuMIn para R (MuMIn: Multi-model inference, R package). Primero, se ajustó un modelo mixto donde se usaron las variables ambientales sin interacción como variables fijas. El estudio (estudios publicados o muestreo propio, Cuadro 2.1) que aportó el dato de la población se utilizó como variable aleatoria, y la infección como variable dependiente. Tras ajustar el modelo se generaron todos los modelos posibles y estos se organizaron según el AIC (Criterio de información de Akaike) más bajo. A partir de los modelos generados se obtuvo la importancia de las variables según las veces que aparecía en los modelos y el AIC de cada modelo (según Maestre et al. 2012). También se analizó cada variable ambiental de forma independiente para analizar el patrón de variación en la de infección respecto a cada variable mediante un glm (modelos lineales generalizados), donde la infección de simbiosis se utilizó como variable dependiente y las

variables ambientales como independientes. Además, se realizó un análisis de correlación para estudiar la relación entre las variables ambientales.

Para el análisis de la variación de la infección a lo largo del gradiente en situaciones de clausura y pastoreo se utilizó un modelo mixto generalizado usando el paquete Lme4 del programa estadístico R (Bates et al. 2015). Se tomó cada punto de muestreo como variable aleatoria, precipitaciones y régimen de pastoreo (clausura o pastoreo) como variables fijas, y la infección como variable dependiente. El modelo se ajustó a una distribución binomial con una función logit. El modelo no sufrió de sobredispersión (aproximadamente 1). Además, se analizó la diferencia de infección para cada especie en situaciones de pastoreo y clausura para evaluar el efecto de la simbiosis independiente de las variables ambientales usando un análisis de frecuencias Chi cuadrado. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico R (R Development Core Team 2013).

Resultados

Se obtuvieron 181 poblaciones de los relevamientos bibliográficos y a campo (Cuadro 2.1). Las especies más representadas fueron *Lolium multiflorum*, *Bromus auleticus*, *Bromus setifolius*, *Phleum alpinum*, las cuales aportaban más de 20 poblaciones cada una al análisis.

La productividad primaria neta y las precipitaciones explicaron la mayor proporción de la variación en la infección del endófito en el gradiente analizado (Cuadros 2.2 y 2.3).

Cuadro 2. 2 Resumen de los valores de importancia de las variables ambientales explicativas de la distribución de la simbiosis. Cuanto más cercano a 1, más importante la variable.

	Productividad (gC.m ⁻² . año ⁻¹)	Precipitaciones (mm .año ⁻¹)	Altitud (msnm)	Temperatura(°C)
Importancia	0,98	0,87	0,66	0,33

Cuadro 2. 3 Los diez modelos de menor AICc generados para evaluar la importancia de las variables ambientales responsables de la distribución regional de la simbiosis. Las celdas sombreadas representan situaciones donde el modelo incorpora la variable. La productividad (PPN) es la variable de mayor importancia, se encuentra en los primeros 8 modelos con menor AICc (el ajuste del modelo aumenta al disminuir el AICc).

Infección simbiosis=	Altitud (msnm)	PPN (gC/m ² *año)	Precipitación (mm/año)	Temperatura (°C)	df	AICc	delta	weight
					6	-747,15	0,00	0,43
					7	-745,30	1,85	0,17
					5	-745,12	2,03	0,16
					6	-744,07	3,08	0,09
					4	-742,67	4,48	0,05
					5	-741,76	5,39	0,03
					6	-741,76	5,40	0,03
					5	-741,67	5,48	0,03
					4	-740,02	7,13	0,01
					5	-737,90	9,25	0,00

La incidencia promedio del endófito de las poblaciones aumentó con la productividad primaria, la precipitación y la temperatura. En cambio, la altitud tuvo una relación negativa (Cuadro 2.4, Figura 2.2).

Cuadro 2. 4 Relación entre la infección y las diferentes variables ambientales analizadas (productividad primaria neta, precipitación anual promedio, temperatura anual promedio y altitud).

	Productividad	Precipitaciones	Temperatura	Altitud	Log Altitud
Productividad	1				
Precipitaciones	0,8	1			
Temperatura	0,78	0,98	1		
Altitud	-0,39	-0,32	-0,20	1	
Log (Altitud)	-0,68	-0,60	-0,50	0,74	1

Cuadro 2. 5 Correlación de Pearson entre las variables usadas en el análisis. La correlación es mayor cuando los valores se acercan a 1 o -1.

Modelo	Unidades	F	P
Productividad primaria neta	gC ha ⁻¹ año ⁻¹	F ₁₋₁₈₀ = 14,16	P< 0,001
Precipitación anual	mm año ⁻¹	F ₁₋₁₈₀ = 14,64	P< 0,001
Temperatura anual	°C	F ₁₋₁₈₀ = 24,015	P< 0,001
Altitud	msnm	F ₁₋₁₈₀ = 15,94	P< 0,001

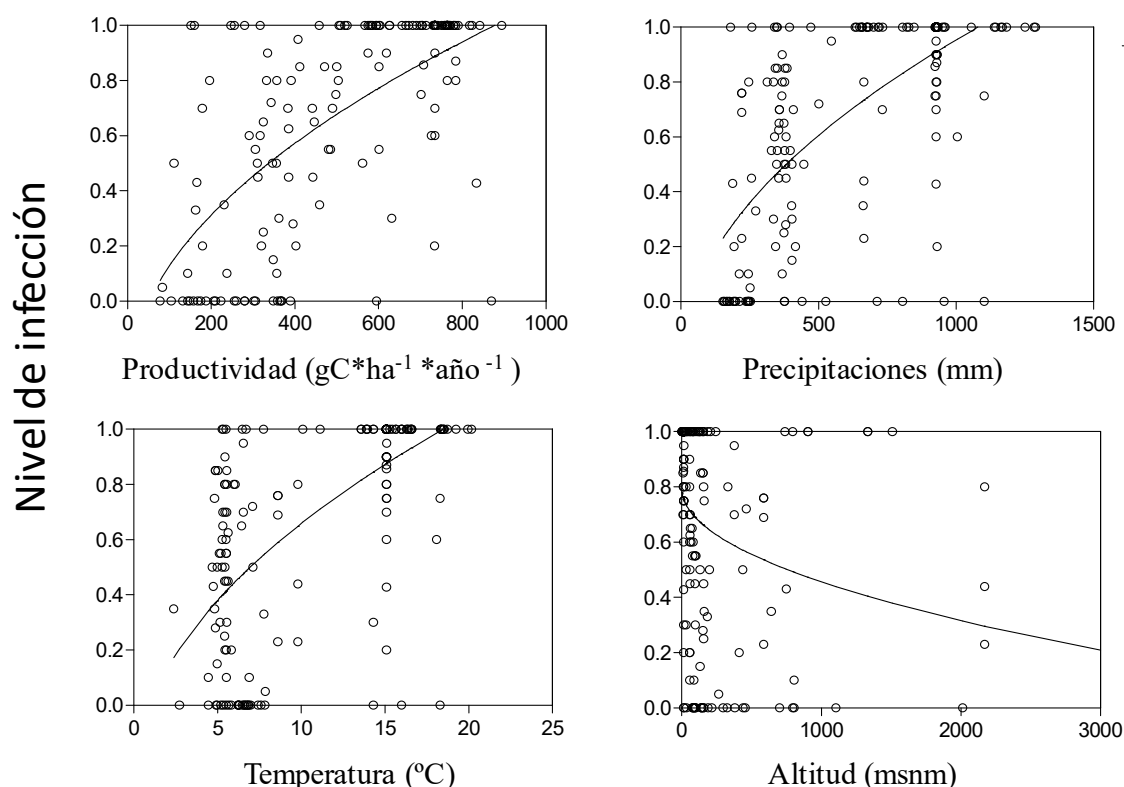


Figura 2.2 Relación entre las variables ambientales analizadas y la infección. Los círculos representan el nivel de infección de cada población y las líneas continuas los valores predichos por el modelo.

Las variables analizadas mostraron diferente grado de correlación entre ellas, especialmente entre productividad, precipitaciones y temperatura. Esto sugiere que estas variables explican una parte similar de la variabilidad encontrada, al contrario de lo que ocurrió con la altitud que mostró correlaciones bajas y negativas, pero que aumenta al transformar la variable usando el logaritmo de la altitud (Cuadro 2.5).

A lo largo de los 5 sitios muestreados a campo (Cuadro 2.6) se recolectaron 30 especies de pastos C_3 de los cuales 11 presentaron la simbiosis. Todas las especies habían sido previamente documentadas como hospedantes de endofitos *Epichloë* (Cuadro 2.7). La simbiosis a lo largo del gradiente estudiado reveló variabilidad tanto en la proporción de especies de pastos que establecen la simbiosis dentro de la comunidad vegetal (Cuadro 2.7, 2.8) como del nivel de infección en aquellas especies que la establecen. La menor proporción de especies de la comunidad que establecieron la simbiosis se registró en el Distrito del Golfo de la Estepa patagónica (sitio 2), donde ninguna de las especies presentó la simbiosis, mientras que la mayor proporción de gramíneas con la simbiosis se registró en los pastizales de la Pampa Deprimida (sitio 3), donde entre el 60 y 75% de las gramíneas templadas muestreadas presentó la simbiosis (Cuadro 2.7 y Cuadro 2.8).

Cuadro 2. 6 Ubicación de los sitios de muestreo de un gradiente de productividad primaria neta y precipitaciones. Para cada sitio se indican las temperaturas y precipitaciones anuales promedio, la productividad y la altitud sobre el nivel del mar.

Lugar	Productividad (gC*ha-1*año-1)	Temperatura (°C)	Precipitaciones (mm)	Altitud (msnm)	Longitud	Latitud
Distrito occidental patagónico	91,8	8,6	221	587	-70,52947	-45,5148
Distrito del Golfo de San Jorge	150,2	13,1	167	122	-65,133334	-42,8
Pampa deprimida	875,4	15,1	928	16	-58,279597	-36,263213
Chaco Serrano	317,7	9,8	665	2169	-64,78066	-31,60118
Pampa húmeda	655,1	18,3	1103	15	-58,353119	-32,50445

Cuadro 2. 7 Lista de gramíneas encontradas en los relevamientos ordenados del punto más al menos árido. En gris se resaltan los puntos de muestreo donde se encontraron. Se marcó con "Simbiosis" cuando se encontró que formaba simbiosis con *Epichloë*.

Especie	Distrito occidental patagónico (1)	Distrito del Golfo de San Jorge (2)	Pampa deprimida (3)	Chaco Serrano (4)	Pampa húmeda (5)
<i>Briza sp.</i>					
<i>Briza subaristata</i>					
<i>Bromus auleticus</i>					
<i>Bromus brachyanthera</i>			Simbiosis		
<i>Bromus pictus</i>					
<i>Bromus setifolius</i>	Simbiosis				
<i>Danthonia montevidensis</i>					
<i>Deyeuxia sp.</i>					
<i>Festuca argentina</i>	Simbiosis				
<i>Festuca cicinata</i>					
<i>Festuca hieronymi</i>				Simbiosis	
<i>Hordeum comosum</i>	Simbiosis				
<i>Lolium multiflorum</i>			Simbiosis		
<i>Pappostipa humilis</i>					
<i>Pappostipa iniduloides</i>					
<i>Pappostipa neai</i>					
<i>Pappostipa neesiana</i>					
<i>Pappostipa speciosa</i>					
<i>Pappostipa speciosa sub mayor</i>					
<i>Pappostipa speciosa sub speciosa</i>					
<i>Pappostipa tenuis</i>					
<i>Piptochaetium montevidensis</i>					
<i>Piptochaetium stipoides</i>					
<i>Piptochaetum sp</i>					
<i>Poa guardiana</i>					
<i>Poa lanigera</i>					Simbiosis
<i>Poa lanuginosa</i>	Simbiosis				
<i>Poa ligularis</i>					
<i>Poa stuckertii</i>				Simbiosis	
<i>Schedonorus arundinaceus</i>			Simbiosis		

Cuadro 2. 8 Infección del endófito promedio, proporción de especies y número de especies en los 5 puntos de muestreo en situación de clausura y pastoreo. No se encontró ninguna población de especies con simbiosis en el Distrito del Golfo de San Jorge a pesar de que se muestrearon poblaciones en las que la simbiosis ha sido documentada en otros estudios.

Sitio	Nivel de infección	Proporción de especies con simbiosis	Cantidad de especies C ₃	Longitud	Latitud
Clausura					
Distrito occidental patagónico	0,38	0,44	9	-70,52947	-45,5148
Distrito del Golfo de San Jorge	0	0	7	-65,133334	-42,8
Pampa deprimida	0,84	0,75	4	-58,279597	-36,263213
Chaco Serrano	0,38	0,50	2	-64,78066	-31,60118
Pampa húmeda	0,7	0,25	4	-58,353119	-32,50445
Pastoreo					
Distrito occidental patagónico	0,31	0,44	9	-70,52947	-45,5148
Distrito del Golfo de San Jorge	0	0	7	-65,133334	-42,8
Pampa deprimida	0,9	0,60	5	-58,279597	-36,263213
Chaco Serrano	0,29	0,43	7	-64,78066	-31,60118
Pampa húmeda	0,5	0,17	6	-58,353119	-32,50445

Este conjunto de datos no mostró efectos significativos ni de las variables ambientales ni del régimen de pastoreo doméstico, excepto un efecto de la altitud, que al igual que en el análisis que incluía también los datos publicados en otros estudios, tuvo una relación negativa con la infección (Cuadro 2.9, Figura 2.4).

Cuadro 2. 9 Resultados del análisis de la variación de la infección de simbiosis en las poblaciones a lo largo de los gradientes ambientales y bajo distinto régimen de pastoreo (clausura o pastoreo) (* p-valor < 0.05). (PPN = productividad primaria neta; PPA= Precipitaciones promedio anuales)

Modelo	Variable	F	P-valor
PPN X Régimen de pastoreo	PPN	F= 0,04	P= 0,40
	Régimen de pastoreo	F= 48,17	P= 0,10
	PPN X Régimen de pastoreo	F= 17,62	P= 0,20
PPA X Régimen de pastoreo	PPA	F= 0,04	P= 0,94
	Régimen de pastoreo	F= 1,01	P= 0,54
	PPA X Régimen de pastoreo	F= 0,53	P= 0,47
Altitud X Régimen de pastoreo	Altitud	F= 8,24	P= 0,008*
	Régimen de pastoreo	F= 0,06	P= 0,36
	Altitud X Régimen de pastoreo	F= 0,76	P= 0,38
Temperatura X Régimen de pastoreo	Temperatura	F= 1,55	P= 0,25
	Régimen de pastoreo	F= 0,06	P= 0,96
	Temperatura X Régimen de pastoreo	F= 0,007	P= 0,93

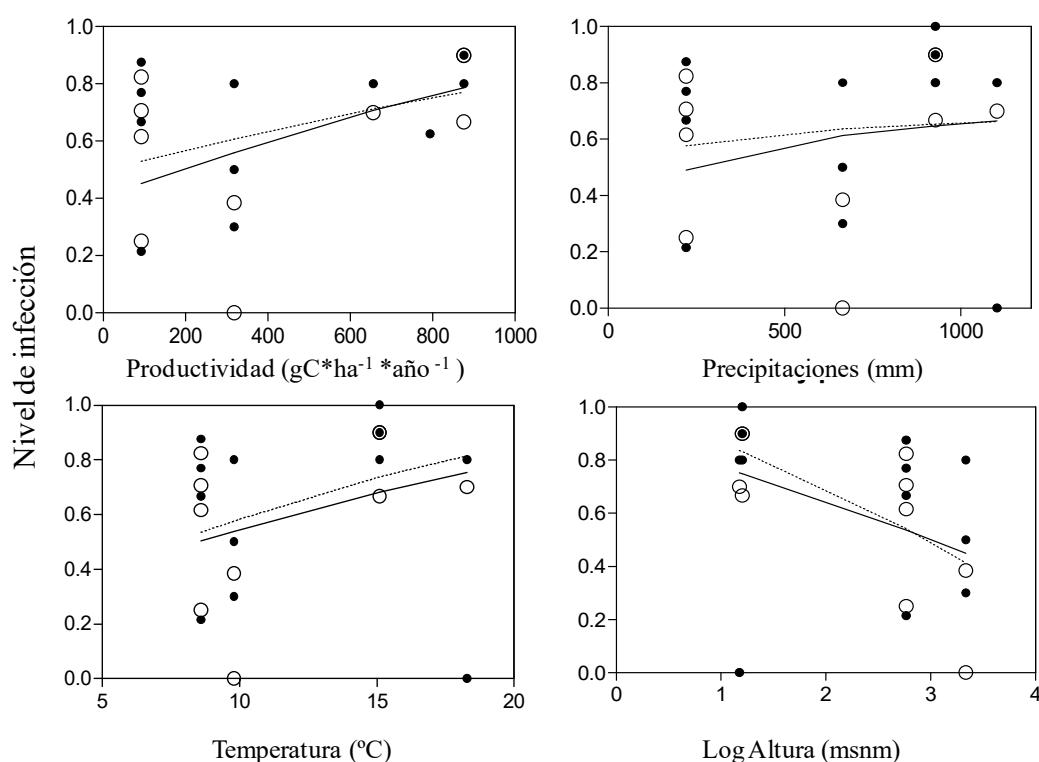


Figura 2.4 Relación del nivel de infección en los diferentes regímenes de pastoreo, negro pastoreo y blanco clausura. La línea continua representa la predicción del modelo para el pastoreo y la discontinua para la clausura.

De las especies hospedantes, solo tres revelaron diferencias de la infección entre pastoreo y clausura, dos de ellas con mayor infección en clausura y la restante con mayor infección en pastoreo (Figura 2.5).

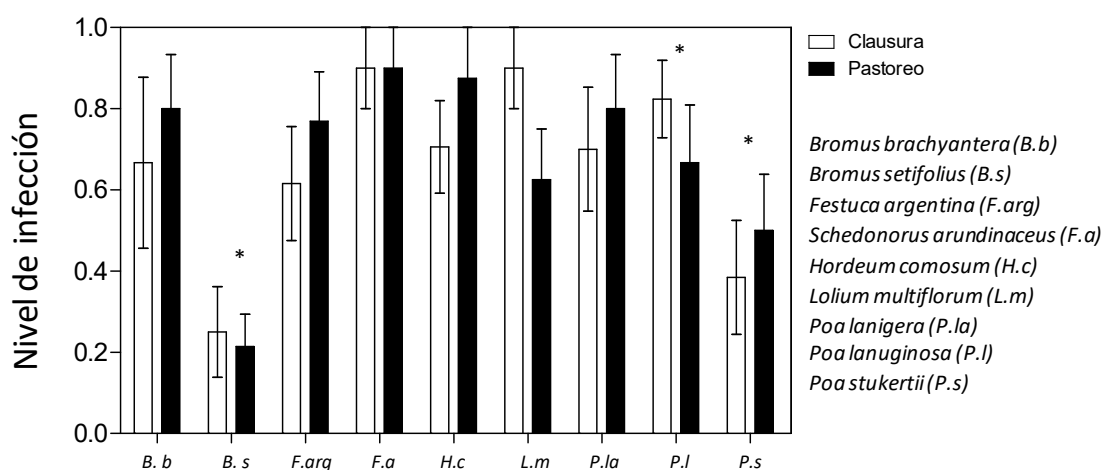


Figura 2.5 Nivel de infección para cada especie en situaciones de clausura (blanco) y de pastoreo (negro) independiente de la localización (Media \pm error estándar). El * denota diferencias significativas ($p < 0.05$) entre clausura y pastoreo.

Discusión

El nivel de infección del endófito a lo largo del gradiente analizado a partir de la combinación de los datos publicados y de los datos propios mostró una relación positiva con la productividad, las precipitaciones y la temperatura, y una relación negativa con la altitud. La productividad explicó la mayor proporción de la variación, seguida de las precipitaciones. En cambio, el análisis basado exclusivamente en los muestreos a campo no revelaron ni un patrón regional ni diferencias debidas al régimen de pastoreo, aunque 3 de las 11 especies mostraron diferencias significativas del nivel de infección entre pastoreo y clausura, pero sin un sentido consistente.

El análisis de importancia mostró a la productividad primaria como la variable más relevante para explicar la variación geográfica en la incidencia de la simbiosis. El único estudio que comprende un gradiente de productividad similar al de esta tesis (50 a 1600 gC ha⁻¹año⁻¹), pero con información correspondiente a sistemas de todo el planeta, encontró resultados similares (Semmartin et al. 2015). La productividad primaria neta es un indicador que refleja la realidad biótica y abiótica de los sistemas, y depende tanto de los factores ambientales (e.g. temperatura, precipitaciones, nutrientes en el suelo, pestes) (Sala et al. 1988, Oesterheld et al. 1998) como de las características de las especies que las vuelven más o menos hábiles para capturar recursos. Además, la productividad nos permite inferir la presión de herbivoría de un sistema, que es proporcionalmente mayor en lugares con mayor productividad y puede variar desde un 20% de la productividad primaria neta aérea en sitios poco productivos hasta más del 60% en sitios muy productivos (Oesterheld et al. 1992, 1998). Por otro lado, los lugares más productivos, que a su vez son los lugares con mayores precipitaciones, se caracterizan también por presentar eventos de sequía con mayor frecuencia que en las zonas más áridas (menor precipitación promedio anual) (Knapp et al. 2015). Por lo tanto, sobre la base en estas características de la productividad y debido a la alta correlación positiva entre productividad precipitaciones ($r=0,8$), proponemos que al aumentar la productividad, es decir un aumento de la herbivoría potencial y la presión competitiva sobre el hospedante, la simbiosis sería favorecida al mejorar el beneficio relativo (respecto a las plantas sin simbiosis) que aporta al hospedante como defensa contra herbivoría (Clay 1996, Schardl 2010), al mejorar su capacidad competitiva (Malinowski et al. 1997) y su mayor capacidad de resistir eventos de sequía (Malinowski y Belesky 2000, Saikkonen et al. 2010).

La relación de la simbiosis con la aridez presenta resultados contrastantes en la bibliografía. Nuestros resultados añaden otra evidencia a aquellos que describen una menor infección de simbiosis asociada a la aridez (Novas et al. 2007, Semmartin et al. 2015) en contraste a lo descrito en varios otros (Lewis et al. 1997, Saona et al. 2010, Afkhami 2012). En la literatura se confunde la aridez con la sequía. La capacidad de resistir la sequía (estrés hídrico puntual) está muy estudiada en experimentos de invernáculo, con especies mesofíticas (Morse et al. 2002, Hahn et al. 2008). Muchos de los trabajos que asocian esta capacidad de resistencia a la distribución de la simbiosis lo hacen en ambientes que no presentan niveles altos de aridez, especialmente en ambientes mediterráneos que se caracterizan por ser bastante productivos y presentar periodos de sequías estivales, por lo que la capacidad de resistir la sequía puede ser un factor que beneficie el mantenimiento de

la simbiosis en estos ambientes (Lewis et al. 1997, Afkhami 2012, Gibert et al. 2012). Sin embargo, en ambientes áridos este tipo de dinámica de sequías anuales no son comunes, Knapp y colaboradores (2015) mostraron que los eventos de sequía en ambientes áridos son poco frecuentes y están asociados a grandes disminuciones de las precipitaciones (un 60% mayores que las necesarias en sistemas húmedos), por lo tanto, en ambientes áridos el hospedante se beneficiaría muy esporádicamente de la capacidad de resistencia a la sequía que puede aportar la simbiosis, por lo que difícilmente actuaría como un motor para su mantenimiento.

Los resultados muestran una relación negativa entre la infección y la altitud acompañada de una gran variabilidad, ya que a lo largo del gradiente se observaron valores entre 0 y 100% de infección. Estos resultados coinciden con los pocos estudios donde se analizó la relación de esta simbiosis con la elevación (Granath et al. 2007, Bazely et al. 2007), en los cuales se presentan dos patrones opuestos para diferentes especies, negativo para *Festuca rubra* en Suecia en ecosistemas de altura a lo largo de un gradiente de 361 a 1227 msnm, y positivo para *Festuca ovina* en el mismo gradiente, que presentaba infecciones altas a mayor altura. En base a nuestros resultados y las pocas evidencias que se encuentran en la literatura, parece que esta simbiosis, en general, está negativamente relacionada con la altura. Esta relación puede ser producto de un incremento en el estrés ambiental que sufre el hospedante y que puede limitar el *fitness* de la simbiosis disminuyendo su frecuencia, como discute Granath et al. (2007), con la temperatura. Pero estos resultados también apuntan hacia un carácter especie-dependiente de esta relación, donde la respuesta está íntimamente ligada a la identidad del hospedante.

En los extremos más fríos del gradiente la infección fue menor. Estos resultados apoyan los pocos trabajos que describen esta relación: Granath et al. (2007) y Semmartin et al. (2015). Además, Ju et al. (2006) determinó que la temperatura mínima a la que *Festuca arundinacea* puede mantener el crecimiento era menor a la que necesitaba el endofito para mantener el suyo, sugiriendo que en lugares con grandes periodos fríos estos pueden afectar negativamente la capacidad de crecimiento del endofito y no a la del hospedante, lo que daría lugar a una menor capacidad de colonización de la semilla, y puede ser una razón que explicaría la baja infección en estos lugares. Por otro lado, nuestros resultados mostraron una alta correlación entre las temperaturas, las precipitaciones y la productividad. Es decir, a lo largo del gradiente, los lugares con bajas temperaturas presentan también bajas precipitaciones y baja productividad, lo que da lugar a ambientes extremos donde la incidencia del endófito es menor. Se suma de esta manera otra evidencia que apoya la idea de que en situaciones muy extremas la simbiosis suele presentar una menor incidencia (Novas et al. 2007, Semmartin et al. 2015).

Los patrones descritos anteriormente entre la simbiosis y las variables ambientales no se vieron afectados por situaciones contrastantes de herbivoría doméstica (clausura y pastoreo). La literatura describe que en una escala local la capacidad defensiva que aporta la simbiosis puede tener un gran impacto en la comunidad vegetal y en la infección en las poblaciones (Clay et al. 2005, Rudgers y Clay 2007, Rudgers et al. 2016, Capítulo III). Nuestros resultados muestran que este efecto del pastoreo dependen de las especies, ya que solo 3 presentaron diferencias en la infección en clausura y pastoreo. Dos de ellas, *P. lanuginosa* y *B. setifolius*, ambas muy palatables, en estos sistemas donde se encuentran (Distrito occidental patagónico, Distrito del Golfo de San Jorge) sufren una gran presión de

herbivoría que puede tener un impacto en la aptitud ecológica del hospedante, y por lo tanto afectar al mantenimiento de la simbiosis (ver Capítulo III). En cambio, *P. stuckertii*, que muestra mayor infección en situaciones de pastoreo, por un lado es poco palatable (Poca et al. 2014, y por otro lado, la población relevada correspondió a una zona situada dentro del Parque Nacional de la Quebrada del Condorito y cerca de campos privados en las que el pastoreo es moderado y no supone un daño del hospedante por sobrepastoreo (Cingolani et al. 2014). Una posible razón por la que solo vemos efecto en estas especies es que las clausuras solo limitaban la entrada de herbívoros domésticos, por lo que la simbiosis podría seguir cumpliendo un papel como defensa contra herbívoros invertebrados y vertebrados de pequeño tamaño (Crawford et al. 2010, Uchitel et al. 2011, García Parisi et al. 2014) y, por lo tanto, seguir manteniendo niveles altos en las clausuras como consecuencia de este tipo de herbivoría.

Como conclusión, en este capítulo se muestra una relación entre la distribución regional de la simbiosis en poblaciones silvestres y las variables ambientales analizadas. La simbiosis no se vio favorecida en las zonas más extremas de los gradientes, especialmente en los lugares más áridos o de mayor altitud. Añadiendo una evidencia más a la idea de que en situaciones de mucho estrés ambiental esta simbiosis sería perjudicada (Novas et al. 2007, Semmartin et al. 2015). Además, aunque no se observó una relación consistente entre los regímenes de pastoreo (clausura y pastoreo) y el nivel de incidencia del endófito, los sitios pastoreados ocasionalmente tuvieron una mayor incidencia y en otras menor en algunas especies que se encontraban en los extremos de los gradientes (*B. setifolius* y *P. lanuginosa*, extremos más árido y *P. stuckertii* en el extremo de mayor altitud). Queda por analizar si este efecto sobre estas especies por parte del pastoreo es consecuencia de características propias del hospedante, como la palatabilidad, o está relacionado con una situación de estrés ambiental, que hace que la simbiosis sea más vulnerable al pastoreo. Analizar si existe una relación entre el estrés ambiental y la susceptibilidad al pastoreo aportaría un conocimiento importante para el manejo y conservación de esta simbiosis en sistemas áridos o con alto estrés ambiental.

Capítulo III: Importancia de la intensidad del pastoreo y la palatabilidad para el mantenimiento de las simbiosis en una estepa semiárida

Introducción

Los herbívoros presentan una gran capacidad de seleccionar el forraje que consumen, desplegando comportamientos y mecanismos muy complejos en la toma de decisiones que parecen redundar en su beneficio nutricional (Bailey et al. 1996). En el caso de los herbívoros domésticos y los pastos, la preferencia del herbívoro se ve determinada principalmente por factores nutricionales y por su abundancia relativa en la comunidad (Cid y Brizuela 1994, Bailey et al. 1996) ya que, a diferencia de otras familias, los pastos no presentan metabolitos secundarios o estructuras que desalienten el consumo (defensas) (Smit et al. 2006, O'Donovan and Delaby 2008, Curran et al. 2010).

Cuando se introduce la simbiosis entre pastos y hongos endófitos como los estudiados en esta tesis, se agrega un tercer actor a la relación entre pastos y herbívoros domésticos que puede influenciar la preferencia debido a la producción de compuestos secundarios desalentadores del consumo (Leuchtman et al. 2000). Así, la triple interacción hongo – pasto - herbívoro resulta altamente compleja, ya que, por un lado, la defoliación puede afectar el crecimiento de la planta y por lo tanto también afectar negativamente al endófito, en especial en situaciones de sobrepastoreo. Por otro lado, el endófito puede generar compuestos secundarios (alcaloides) que causen desde la repulsión apenas detectable en los animales hasta la toxicidad aguda (Clay y Schardl 2002, Faeth 2002, Saikkonen et al. 2013, Schardl et al. 2013, Luo et al. 2015). Finalmente, el beneficio que el hospedante obtiene del endófito dependerá del grado de preferencia que tenga ese hospedante para los animales (grado de palatabilidad). En principio, se esperaría que en las especies con características que desalientan el consumo, como una mayor cantidad de lignina, la producción de compuestos secundarios, porte postrado, etc. (Senft et al. 1987, Bailey et al. 1996) el endófito aporte una “defensa” relativamente menos importante que en las especies que no poseen esas características, y que por lo tanto son intrínsecamente más preferidas.

Los resultados de una serie de estudios a campo que documentaron una mayor proporción de plantas infectadas en sitios con mayor intensidad o historia de pastoreo se han interpretado como una evidencia del papel defensivo de esta simbiosis (Bazely et al. 1997, Granath et al. 2007, Koh y Hik 2007, Rudgers et al. 2016). Por lo tanto, se espera que la triple interacción hongo-planta-herbívoro esté mediada por la palatabilidad de la planta y que tanto la infección del hongo en un pasto determinado como la biomasa del pasto sean más afectados por los herbívoros cuanto más palatables y preferidos sean.

Entre las especies de pastos, los herbívoros prefieren aquellas que presentan menor concentración de lignina, mayor concentración de nitrógeno y una alta digestibilidad (McNaughton 1984, Senft et al. 1987). En el distrito Occidental de la estepa patagónica coexisten pastos con diferentes combinaciones de valor nutritivo y defensas. La biomasa de las especies con valores altos de digestibilidad (nutritivos) disminuye en situaciones de alta

intensidad de pastoreo (Ares et al. 1990, Perelman et al. 1997, Oñatibia et al. 2015, Oñatibia y Aguiar 2016). A pesar de la importancia de la simbiosis como posible defensa en situaciones de pastoreo, desconocemos hasta qué punto la defensa brindada por el hongo endófito puede modificar este patrón de biomasa con respecto a la intensidad de pastoreo.

La simbiosis aporta capacidades defensivas generalmente mediadas por la producción de compuestos secundarios como los alcaloides (Porter 1994). Dependiendo del conjunto de alcaloides que produzca el hongo, la simbiosis puede afectar a herbívoros vertebrados o invertebrados (Leuchtmann et al. 2000, Clay y Schardl 2002, Faeth 2002, Saikkonen et al. 2013, Schardl et al. 2013, Luo et al. 2015). Por ejemplo, para herbívoros domésticos, la presencia de ergots o lolitrem b puede tener un efecto tóxico, a veces mortal (Yates et al. 1989, Prestidge 1993). Sin embargo, aún en ausencia de estos grupos de alcaloides, se han observado efectos desalentadores del consumo pero sin efecto tóxico aparente, como el que se presenta en el Capítulo IV de esta tesis. Es por esto que el beneficio que el hospedante obtenga de la simbiosis estará sujeto a la presencia del herbívoro y a la eficacia de los compuestos secundarios generados por el hongo contra dicho herbívoro.

El objetivo de este capítulo fue analizar la incidencia de la simbiosis en la comunidad de pastos de una estepa semiárida bajo distintas intensidades de pastoreo y evaluar si un eventual efecto defensivo difiere entre pastos más y menos preferidos por el ganado. La hipótesis de trabajo es que el pastoreo afecta la frecuencia de infección modificando la capacidad competitiva del hospedante. Por lo tanto, la frecuencia de la infección dependerá de la intensidad de la herbivoría y de la preferencia del ganado sobre el hospedante. Esperamos encontrar una frecuencia de infección máxima en sitios con pastoreo moderado y más bajas en clausura y en sobrepastoreo. A su vez, este patrón de la frecuencia de infección guardará relación directa con la biomasa de los individuos y será más pronunciada en el caso de especies palatables que en las menos palatables.

Metodología

Lugar de estudio

El experimento se llevó a cabo en la estepa patagónica en el distrito Occidental, en el mismo sitio de muestreo incluido en el Capítulo II. La vegetación predominante es pastizal arbustivo y ha sido históricamente pastoreada por guanacos y, desde hace 100 años, por ovejas. Debido a la intensa y continua explotación para la ganadería, se ha generado una amplia degradación del sistema que se observa en forma de un aumento del suelo desnudo y de arbustos y de especies gramíneas menos preferidas por los herbívoros (Perelman et al. 1997, Oñatibia et al. 2015, Oñatibia y Aguiar 2016).

Diseño experimental y muestreos

Realizamos un relevamiento con el objetivo de cuantificar la frecuencia de infección de la simbiosis (proporción de plantas en una población que presentan la asociación con *Epicloë*) en las diferentes poblaciones de pastos templados (Poacea) presentes en el lugar de estudio. Además, realizamos una clasificación de los pastos en preferidos y no preferidos basada en la información disponible sobre palatabilidad para estas especies (Solmo et al. 1985, Perelman et al. 1997, Adler et al. 2004). Los muestreos se realizaron en tres niveles de

pastoreo: clausura (sin pastoreo) y pastoreo moderado (~ 0.2 oveja ha^{-1} año^{-1}) en un campo experimental del INTA, y pastoreo intenso (~ 0.4 oveja ha^{-1} año^{-1}) en un campo de explotación comercial adyacente al campo experimental. El nivel sin pastoreo consistió en 3 clausuras instaladas previamente en 1972, 1983 y 1994, con tamaños de 2,5 ha, 5ha y 3 ha respectivamente, separadas entre sí entre 1km y 10km. Los lugares con pastoreo moderado e intenso corresponden a tres lotes por cada uno de aproximadamente 200 ha, que en ambos casos han recibido una intensidad de pastoreo constante por más de 20 años (Oñatibia et al. 2015). La composición de la comunidad vegetal de pastos y arbustos (vegetación dominante de la zona) es muy similar en los tres niveles de pastoreo, y las pequeñas diferencias en la composición se le atribuyen exclusivamente a efectos históricos del pastoreo (Cipriotti y Aguiar 2005).

En enero de 2012 se recolectó un total de 456 plantas de los sitios de muestreo. De cada uno de los lotes muestreados se obtuvieron, de forma aleatoria, por lo menos 6 plantas de cada especie (siempre que fue posible) (Cuadro 3.1) que se usaron para estimar la infección en la población (proporción de planta con simbiosis del total de esa especie en ese lote). Para cada planta se usaron 20 macollos, y semillas siempre que fue posible, para determinar si presentaban o no simbiosis. Las plantas se mantuvieron en bolsas de nylon a 5°C hasta el procedimiento de detección del hongo. La detección fue realizada mediante observación por microscopio con rosa de bengala, previo tratamiento de las muestras con hidróxido de sodio (entre 8-12 horas, Bacon y White 1994a, 1994b). Después de la detección del endófito, se realizó una estimación del desempeño de las especies que presentaron la simbiosis. Para esta estimación, se pesó la porción basal de los macollos recolectados de cada especie y en cada situación de pastoreo; se midieron los primeros 6 cm desde la corona en el caso de *H. comosum* y *P. lanuginosa*, y los primeros 10 cm para *F. argentina*, que posee un porte significativamente mayor que las otras especies.

Las especies recolectadas se clasificaron en dos grupos: preferidas y no preferidas. La preferencia se asignó usando la descripción de trabajos previos realizados en los mismos campos experimentales en las mismas especies. Estos trabajos tenían en cuenta la dureza de las hojas, el contenido en lignina, la composición en la dieta de los herbívoros, la cobertura relativa, etc. (Somlo et al. 1985, Perelman et al. 1997, Adler et al. 2004, Semmartin et al. 2004). Durante el muestreo tuvimos limitaciones para estimar la infección en *H. comosum* debido a que solo se pudo encontrar en uno de los tres lotes disponibles en el nivel de pastoreo moderado, y en *F. argentina* debido a que solo se encontró en uno de los tres lotes en el nivel de pastoreo intenso. En *Bromus setifolius*, especie muy preferida, se pudo determinar la presencia de la simbiosis en pastoreo moderado y clausura pero no se encontró en ningún lote de pastoreo intenso, y por esto no fue incluida en el análisis estadístico descrito a continuación.

Análisis estadístico

Para el análisis del cambio de la infección en las poblaciones de pastos a lo largo del gradiente se usaron como especies preferidas *H. comosum* y *P. lanuginosa* y como no preferida *F. argentina*. El análisis se realizó mediante un modelo general lineal y los datos desbalanceados se trataron con la suma tipo III de cuadrados (Shaw y Mitchell-Olds 1993). Las especies y la intensidad de pastoreo se consideraron variables independientes y la infección variable dependiente. Para analizar la biomasa de las plantas se agruparon las

especies para cada nivel de pastoreo y se realizó una ANOVA de una vía y se determinaron las medias de los tratamientos usando el test de Tukey. Los análisis respetaron los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad. Los análisis se realizaron mediante el programa estadístico R (R Development Core Team 2013).

Resultados

Las simbiosis encontradas en este relevamiento correspondieron todas a las ya documentadas en la bibliografía (Iannone et al. 2011, 2013). De las nueve especies recolectadas y analizadas de la comunidad de pastos templados, cuatro presentaron simbiosis (Cuadro 3.1). Tres de ellas son altamente preferidas por los herbívoros: *H. comosum*, *P. lanuginosa*, *B. setifolius* (Somlo et al. 1985, Perelman et al. 1997, Adler et al. 2004) mientras que la cuarta, *F. argentina*, a pesar de presentar una composición nutricional aparentemente similar al resto (e.g., concentración de lignina y nitrógeno) (Adler et al. 2004) no es consumida por los ovinos debido a sus efectos tóxicos, presumiblemente por su asociación con *Epichloë tembladera* (Casabuono y Pomilio 1997, Iannone et al. 2011). El resto de especies, tanto preferidas (*Bromus pictus* y *Poa ligularis*) como no preferidas (*Pappostipa speciosa* sub. *mayor*, *Pappostipa speciosa* sub. *speciosa* y *Pappostipa humilis*), no presentó simbiosis (Cuadro 3.1).

Cuadro 3. 1 Especies de pastos de la comunidad en las que se encontraron endófitos del género *Epichloë* (negrita) y en las que no (texto plano). Se clasificó las especies por preferencia basándose en Somlo et al. (1985), Perelman et al. (1997), y Adler et al. (2004). El número de plantas de cada especie recolectado por nivel de pastoreo está indicado en las columnas de la derecha.

Especie de pastos	Preferencia	Número total de plantas recolectadas		
		Clausura	P. Moderado	P. Intenso
<i>Bromus pictus</i>	Preferida	15	8	9
<i>Bromus setifolius</i>	Preferida	16	6	0
<i>Hordeum comosum</i>	Preferida	17	8	15
<i>Poa lanuginosa</i>	Preferida	17	12	16
<i>Poa ligularis</i>	Preferida	21	28	21
<i>Festuca argentina</i>	Tóxica (No-preferida)	13	13	10
<i>Pappostipa humilis</i>	No-preferida	21	27	20
<i>P. speciosa</i> sub. <i>mayor</i>	No-preferida	21	30	21
<i>P. speciosa</i> sub. <i>speciosa</i>	No-preferida	21	28	22

El efecto de la intensidad de pastoreo sobre la infección difirió entre las tres especies analizadas: *H. comosum*, *P. lanuginosa* y *F. argentina*. Las dos preferidas (*H. comosum* y *P. lanuginosa*) presentaron una menor infección bajo pastoreo intenso, mientras que la infección de la no preferida (*F. argentina*) no cambió con la intensidad de pastoreo (Figura 3.1).

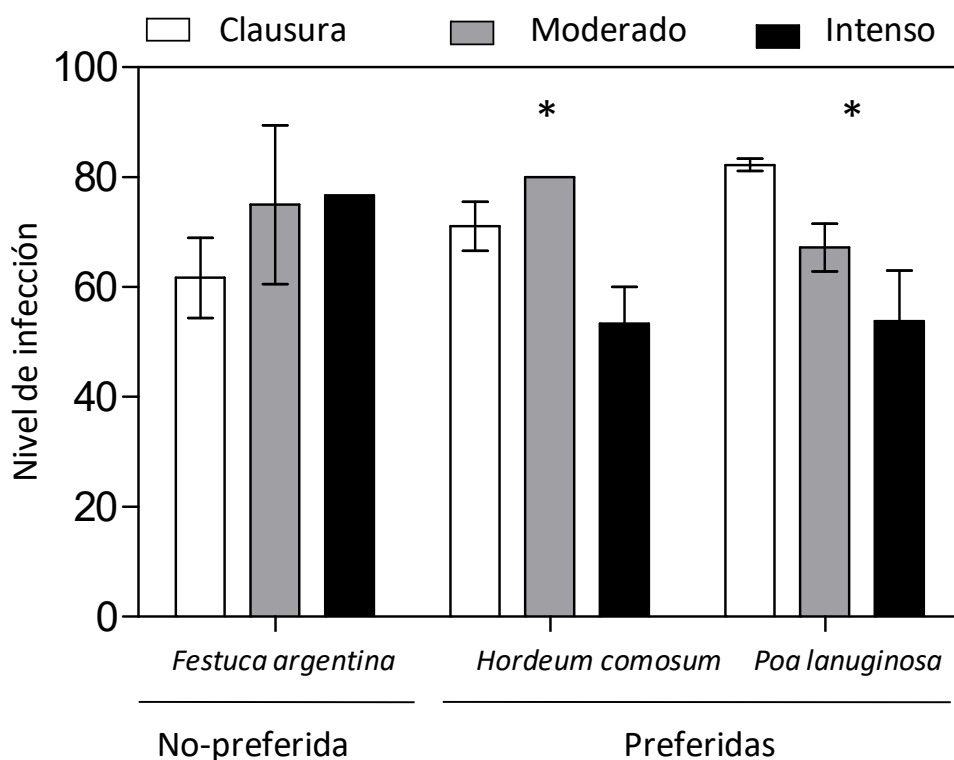


Figura 3. 1 Nivel de infección con endófitos del género *Epichloë* en dos especies preferidas y una no preferida, a lo largo del gradiente de pastoreo en la estepa semi-árida de la Patagonia (clausura, pastoreo moderado, pastoreo intenso). Las barras representan la media \pm 1 DE y el asterisco las diferencias significativas a lo largo del gradiente para cada especie, $p \leq 0.05$.

La biomasa de los macollos fue significativamente menor bajo pastoreo intenso para *P. lanuginosa* y bajo clausura para *F. argentina*, mientras que se observaron diferencias para *H. comosum* entre clausura y los dos niveles de pastoreo (Cuadro 3.2).

Cuadro 3. 2. Biomasa en gramos (media \pm EE) de la porción basal de los macollos de las especies con simbiosis *Epichloë* a lo largo del gradiente de pastoreo. Letras diferentes describen diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$).

Especies de pastos	Peso por macollo (gramos de materia seca)		
	Clausura	Moderado	Intenso
<i>Hordeum comosum</i>	0,08 \pm 0,01 a	0,05 \pm 0,01 b	0,06 \pm 0,03 b
<i>Poa lanuginosa</i>	0,12 \pm 0,03 a 0.a03ab	0,1 \pm 0,02 ab	0,09 \pm 0,02 b
<i>Festuca argentina</i>	0,17 \pm 0,02 a	0,2 \pm 0,04 b	0,23 \pm 0,03 b

Discusión

Los resultados muestran que el efecto de la herbivoría sobre la simbiosis puede variar dependiendo de la intensidad de pastoreo y de la preferencia del hospedante. Para las tres especies estudiadas, las cuales presentaban características nutricionales similares (Adler et al. 2004), la variación del pastoreo no tuvo efecto o tuvo un efecto negativo sobre la infección. Esta variación en el efecto del pastoreo puede estar relacionada con el beneficio relativo que aporta la simbiosis y la preferencia del hospedante. El efecto que puede tener la herbivoría sobre la simbiosis parece estar relacionado con un efecto indirecto al modificar la aptitud ecológica del hospedante (biomasa) que afectó el tamaño de los individuos para las dos especies con mayor preferencia.

A diferencia de lo documentado por otros autores, este estudio muestra que puede haber una relación negativa entre la intensidad de pastoreo y la infección en las especies preferidas por el ganado. Otros estudios mostraron que el pastoreo es capaz de promover la simbiosis favoreciendo infecciones más altas tanto en sistemas manejados como en naturales (Bazely et al. 1997, Rudgers et al. 2016, Koh y Hik 2007). Estos trabajos atribuyen este aumento a una diferencia defensiva entre asociadas o no a *Epichloë* aportada por la presencia de la simbiosis. En el caso estudiado, las plantas más preferidas no parecen recibir este beneficio defensivo por parte de la simbiosis. Iannone et al. (2015) propone que los beneficios que proporciona la simbiosis en *H. comosum* en esta región parecen estar más relacionados con la capacidad de tolerar la sequía que con la defensa contra herbívoros. Sin embargo, otros trabajos muestran que el endófito puede no brindar tolerancia a la aridez, y que esta capacidad es muy dependiente de la especie (Semmartin et al. 2015, Gundel et al. 2016, Capítulo II).

Los resultados de *F. argentina* muestran que no varía su infección a lo largo del gradiente de pastoreo. En este caso la simbiosis tiene el potencial de generar alcaloides tóxicos que desalientan fuertemente su consumo (Casabuono y Pomilio 1997, Iannone et al. 2011). Por lo tanto, estas plantas al ser menos preferidas y, por lo tanto, menos consumidas, pueden sufrir un menor estrés por herbivoría, lo que situaría a las plantas con endófito en una ventaja competitiva sobre sus congéneres que no lo portan, y que serían más consumidas al carecer de esta defensa, favoreciendo el mantenimiento de la simbiosis. A pesar de que el menor porte (biomasa) de esta especie en la clausura sugiere que podría estar sufriendo un estrés por competencia, el nivel de simbiosis se mantuvo alto y similar (mayor al 80%) a los registrados en las situaciones de pastoreo.

La infección en una población depende, principalmente, de dos factores: la aptitud ecológica relativa del hospedante y la eficiencia de transmisión del hongo (Gundel et al. 2009), ambos muy relacionados entre sí y pueden verse afectados por varios factores de estrés ambiental, como por ejemplo el sobrepastoreo (Gundel et al. 2011a, b, García Parisi et al. 2014). Nuestro caso sigue un patrón ampliamente documentado en la Patagonia en el que el pastoreo por herbívoros domésticos afecta el desempeño individual de las especies más preferidas (Ares et al. 1990, Perelman et al. 1997, Oñatibia et al. 2015, Oñatibia y Aguiar 2016). En el caso de *F. argentina*, el tamaño de las plantas aumenta en situaciones de pastoreo moderado e intenso con respecto a las plantas en situaciones de clausura, presumiblemente como combinación de la presencia de la simbiosis y la acumulación de biomasa muerta en pie que le permiten evadir la herbivoría (Casabuono y Pomilio 1997). A partir de estos resultados proponemos que la intensidad de pastoreo a través de su impacto

en la aptitud ecológica del hospedante es, probablemente, la responsable de la disminución en la infección encontrada en este trabajo.

En conclusión, este estudio muestra una reducción en la infección y en el desempeño del hospedante en las especies preferidas por el ganado. Dentro de las evidencias que muestran los efectos negativos del pastoreo intenso sobre las especies más preferidas, este estudio agrega que las altas intensidades de pastoreo, al debilitar la relación pasto-endófito, aumenta la vulnerabilidad de estas poblaciones frente al pastoreo. En el caso de que la simbiosis aporte toxicidad, como por ejemplo *F. argentina*, *Poa huecu*, *Festuca hieronymi*, y *F. dissitiflora* (Iannone et al. 2011), el hospedante adquiere un nivel de resistencia a la herbivoría que, a pesar de presentar un valor nutritivo intrínseco alto, le permite resistir contextos de alta intensidad de herbivoría.

Capítulo IV: Resistencia, cambios en la preferencia del herbívoro doméstico mediada por la simbiosis

Introducción

Tal como se señaló en el capítulo anterior, los herbívoros manifiestan una alta selectividad durante el forrajeo (Bailey et al. 1996). En el caso de los herbívoros domésticos, las decisiones de consumo de una determinada especie se basan principalmente en la abundancia de esa especie en la comunidad y en las características morfológicas, nutricionales y químicas (e.g. espinas, crecimiento postrado, alto contenido en nitrógeno o la presencia de compuestos secundarios) (Senft et al. 1987, Bailey et al. 1996).

Los pastos generalmente carecen de fuertes defensas morfológicas o químicas, por lo que la preferencia del ganado depende principalmente de la abundancia y de las características nutricionales y estructurales de una determinada población. Es por esto que generalmente a la proporción de las distintas fracciones de fibra, el contenido de lignina, la concentración de materia seca, el contenido de nitrógeno y de los compuestos solubles se les considera factores muy importantes en el cambio de consumo voluntario y en la preferencia de los herbívoros domésticos (Smit et al. 2006, O'Donovan y Delaby 2008, Curran et al. 2010). Esto mismo sucede con las características estructurales como la altura del conopeo, la densidad de macollos y la biomasa en pie (Cid y Brizuela 1994, Bailey et al. 1996).

La simbiosis puede modificar la preferencia de los herbívoros a través de dos vías de resistencia principalmente. Primero, la capacidad de generar alcaloides tóxicos para los herbívoros (Bacon et al. 1977, Clay 1996, Leuchtmann et al. 2000, Schardl et al. 2012, Young et al. 2013) y segundo, mecanismos de resistencia no relacionados con los alcaloides. Esta capacidad de resistencia, aparentemente sin relación con la producción de alcaloides, ha sido descrita en simbiosis no tóxicas en invertebrados y en pequeños vertebrados (Crawford et al. 2010, Uchitel et al. 2011, García Parisi et al. 2014). Se han sugerido varios mecanismos responsables de esta modificación de la preferencia, como la producción diferencial de volátiles (García Parisi et al. 2014, Li et al. 2014) o la incorporación de silicio (Huitu et al. 2014). Sin embargo, queda todavía por demostrar si estas capacidades defensivas vistas en pequeños vertebrados e invertebrados se observan también en herbívoros domésticos.

La simbiosis produce profundos cambios en el hospedante modificando su crecimiento y su metaboloma (Rasmussen et al. 2008, 2009, Dupont et al. 2015), lo que puede modificar la palatabilidad del hospedante. Además, la preferencia de las plantas portadoras de hongos endófitos también podría deberse a modificaciones en el valor nutricional del hospedante como la reducción de los contenidos de fósforo y nitrógeno (Malinowski et al. 1999, 2000) o la digestibilidad de la porción fibrosa (Olivera et al. 2004, Zabalgogazcoa et al. 2006, Soto-Baraja et al. 2015). Un trabajo reciente encontró una menor proporción de fibra en plantas de *Lolium perenne* portadoras del endófito, con respecto a sus congéneres no portadoras, lo que aumentaría la digestibilidad del hospedante y por lo tanto podría favorecer la preferencia del ganado (Soto-Baraja et al. 2015). A pesar de estas evidencias, no se ha analizado si las modificaciones en la digestibilidad y en el valor nutricional del

hospedante producto de la simbiosis pueden o no afectar la preferencia de los herbívoros domésticos.

Lolium multiflorum es una especie anual de crecimiento rápido, con alto valor nutritivo que puede hospedar la simbiosis asintomática para el herbívoro doméstico con el hongo *Epichloë occultans*. En este caso, el endófito no produce alcaloides con efectos tóxicos aparentes sobre el ganado (ergots o lolitrens) aunque sí puede producir alcaloides con efecto tóxico sobre invertebrados o roedores (lolinas y peraminas) (Leuchtman et al. 2000; De Battista 2005, Schardl et al. 2007, Schardl et al. 2013). *L. multiflorum* se encuentra naturalizada en muchos pastizales templados donde ha ganado importancia como forraje de invierno debido al efecto negativo del pastoreo continuo durante el último siglo, que redujo la abundancia de otros pastos invernales nativos y agudizó la escasez de forraje durante esa época del año (Jacobo et al. 2000). Es por esto que, junto con otras especies similares, se ha convertido en un recurso fundamental para la producción ganadera en los pastizales manejados (Blair 1997, Jacobo et al. 2000). Esta especie presenta altas infección (aproximadamente 90 y 100%) en pastizales naturales y manejados de la pampa deprimida (Gundel et al. 2009), es por esto que investigar el posible impacto de la simbiosis sobre el ganado puede ayudar a mejorar las prácticas y el manejo de la producción en zonas de alta importancia ganadera.

El objetivo de este estudio es evaluar si la simbiosis entre *L. multiflorum* y *Epichloë occultans* afecta a la preferencia de los herbívoros domésticos (*Bos taurus*). Para esto usamos dos aproximaciones experimentales: primero, un experimento en parches con el material en pie donde las características estructurales del parche (altura, densidad de macollos) y los valores nutricionales pueden modificar la preferencia del ganado. Segundo, dos experimentos en comederos con el material troceado donde se eliminaban las características estructurales del parche y donde las características de las plantas tenían una mayor papel sobre la preferencia ganado. Nuestra hipótesis es que el posible efecto sobre la preferencia de la simbiosis será mediado por cambios en la composición nutricional, estructural y química generados por la presencia del endófito.

Metodología

Los experimentos se realizaron en la estación experimental INTA-Concepción del Uruguay, entre marzo de 2013 y octubre de 2014, con el objetivo de estudiar la preferencia de los herbívoros domésticos entre forraje ofrecido de una misma especie (*L. multiflorum*) con diferente nivel de infección de *Epichloë occultans* (proporción de plantas de la población que presentan la asociación).

Esta región presenta un clima húmedo con precipitaciones anuales promedio de 1200 mm y temperaturas promedio de 18°C. La vegetación predominante es pastizal, mayoritariamente usado para la producción ganadera y durante las últimas décadas el uso ha variado hacia una producción más centrada en la agricultura (Baldi et al. 2006).

En los experimentos se utilizaron poblaciones de *L. multiflorum*. A diferencia de lo que ocurre en los pastizales de la Pampa Deprimida, esta especie no se encuentra de forma espontánea en el banco de semillas de esta región, aunque presenta un alto rendimiento cuando se cultiva. Estos aspectos facilitaron la experimentación en parcelas con tratamientos que incluían niveles de infección variables. En estos experimentos se utilizaron dos poblaciones de *L. multiflorum* (Lucero y Feliciano) que representan dos

poblaciones con diferencias en su origen geográfico (Lucero, pastizales en Carlos Casares provincia de Buenos Aires, y Feliciano, banquina Ruta 127 provincia de Entre Ríos) que han sido mantenidas puras en el INTA Concepción del Uruguay. Las semillas con simbiosis se obtuvieron partiendo de la población original con aproximadamente un 100% de infección, estas poblaciones se mantienen en cámara y se multiplican a condiciones de campo cada año en la Estación Experimental INTA Concepción del Uruguay. La obtención de las semillas sin simbiosis se realizó por parte del INTA Concepción del Uruguay, para ello se envejecieron las semillas de acuerdo con la metodología de Maddaloni et al. (1989) para *F. arundinacea*, modificada para *L. multiflorum* por (Medvescigh J., Maidana A. De Battita J. y Costa M. datos no publicados). En el caso de esta especie, se prolongó el tiempo de almacenamiento por dos años a temperatura ambiente hasta alcanzar 0% de viabilidad del hongo y luego fueron multiplicadas en condiciones a campo en la estación experimental. Estas semillas igual que las que presentan asociación con *Epichloë* fueron multiplicadas varios años por lo que se descartan efectos maternos o epigenéticos. Para todos los experimentos se usó la población Lucero y en el experimento de comederos (*oferta simple*, ver más abajo) se incluyó la población Feliciano. El nivel de simbiosis de cada población se determinó previamente en el laboratorio según Bacon y White (1994a, 1994b). Para determinar la infección se usaron 30 semillas de cada población, con y sin endófito (100 en total por población). Se calculó la infección como la proporción de semillas con endófito en la muestra.

Se realizó una caracterización estructural y química del material ofrecido en los experimentos, ya que estos factores pueden modificar la preferencia y el desempeño del herbívoro doméstico (O'Donovan y Delaby 2008, Soto-Barajas et al. 2105). En el experimento en parches se midió la biomasa aérea, la densidad de macollos y la altura del conopeo. La biomasa y la densidad de macollos se midieron usando dos cuadros de 30X30 en cada parche. La altura se midió disponiendo aleatoriamente un disco de poliuretano en la superficie del conopeo y midiendo la distancia al suelo. El proceso se repitió 4 veces por parche. Los datos de biomasa fueron pesados en fresco tras la recolección y posteriormente se secó en un horno a 60°C por 48h para medir el peso en seco. Para todas las medidas tomadas en este experimento se dejaron 20cm libres desde el borde de cada parche para evitar un posible efecto borde. En los experimentos en comederos, como el material era troceado tras la recolección, se midió la proporción de biomasa vegetativa y reproductiva. La caracterización química se realizó de forma similar para ambos experimentos. Se analizó la composición de la pared celular en concreto el contenido de fibra detergente neutro (FDN), ácido (FDA) y lignina (Van Soest 1991) y el contenido de nitrógeno (N) usando una digestión de material molido en un procedimiento estándar de Kjeldahl.

Para medir la preferencia se usaron animales de un año con la misma dominancia y raza (*Aberdeen Angus*), con un peso promedio de 220 ± 13 kg. La preferencia fue cuantificada a partir de dos estimadores: el consumo y el tiempo empleado en cada tratamiento (o frecuencia de visitas, solo para el experimento de parches) (Solomon et al. 2014). El consumo se estimó como la diferencia entre el peso seco del material ofrecido y el material remanente (Macoen et al. 2003, Smit et al. 2006). La preferencia, medida como el tiempo de consumo empleado en cada tratamiento, fue registrada cada dos minutos y se registró también la frecuencia de visitas por parche en cada ronda de oferta de 1 hora (Laca 1998).

Tras el experimento de parches, se dejó producir semillas al material no consumido y se reevaluó la infección en la semilla para comprobar que se mantuvieron niveles de infección diferentes entre los tratamientos. Se obtuvo una infección de 65,5% para los parches con alta infección de simbiosis, de 36% para los parches con media infección y de 0% para los parches con baja infección ($p < 0,05$).

Experimento en parches

Para evaluar los efectos del endófito sobre la preferencia de *L. multiflorum*, se sembraron parches monoespecíficos con diferente nivel de infección. En un área de 500m² se generaron 4 bloques donde se prepararon 3 parches (4m² por parche) a los que se asignó los tres tratamientos de forma aleatoria (monocultivos de *L. multiflorum* con 3 niveles de simbiosis: bajo, medio y alto). Un mes antes de la siembra de los tratamientos (marzo de 2013) el área del experimento fue tratada con glifosato (0,8 ml/m²) para remover la vegetación natural y el posible banco de semillas. Los parches se encontraban separados al menos 3 metros de las vallas que dividían los bloques. Los parches fueron fertilizados con 15g/m² de fosfato diamónico (DAP) (40N, 30P, 6K) y 10g/m² de urea. Dos meses después de la siembra se aplicó un herbicida selectivo para especies de hoja ancha (Tordon D30, 0,4 ml/m²) para promover el crecimiento de *L. multiflorum*. Las semillas utilizadas para los niveles de simbiosis pertenecían a la población de Lucero (alto~83,3% y bajo nivel de simbiosis ~0%). Los niveles intermedios de simbiosis fueron obtenidos usando porciones iguales de las dos subpoblaciones de Lucero (alto y bajo nivel de simbiosis), lo que dio lugar a parches con aproximadamente el 41,5% de nivel de simbiosis.

En octubre de 2013 se ofertó el material a tres animales durante aproximadamente 75 minutos por bloque. Los primeros 15 minutos no se registraron y se dejaron como periodo de aclimatación y exploración. Transcurrida la aclimatación, dos observadores, que se encontraban a más de 50 metros del lote, registraron la localización de cada animal cada 2 minutos, durante el período total en cada bloque (~ 75 minutos). El experimento se realizó en dos días, dos bloques por día. El día anterior y durante el experimento no se les permitió el acceso a agua ni a forraje.

Experimento en comederos

Para estos experimentos se utilizaron solo dos niveles de infección: alta o baja y tomaron dos aproximaciones diferentes: *oferta simple*, en el que se ofertó un solo nivel de simbiosis por comedero en dos estados fenológicos (reproductivo y vegetativo) y *oferta+base*, donde se combinaron los dos niveles de simbiosis en cada comedero y se usó el material en estado fenológico vegetativo. El material usado se cultivó en un lote diferente al del experimento de parches. Para el experimento de *oferta simple* también se utilizó material la población Feliciano de *L. multiflorum*. Para el experimento de *oferta simple* en estado reproductivo se sembró el material de ambas poblaciones (Lucero y Feliciano) a principios de mayo de 2013 con una densidad de 20kg de semilla/ha fertilizadas con 80 kg Fosfato diamónico/ha después de la siembra y durante el macollaje se aplicaron 100k/ha de urea. Este proceso se repitió durante mayo del 2014 para el experimento de *oferta simple* en estado vegetativo y para el de *oferta-base*.

Experimento de oferta simple:

Este experimento se realizó en dos etapas fenológicas de las plantas: vegetativo (octubre de 2014) y reproductivo (noviembre de 2013) a fin de detectar la posible variación del efecto de la simbiosis debido a la concentración durante el ciclo vital del hospedante (Ju et al. 2006, Reed et al. 2011). Las dos poblaciones usadas presentaron niveles de infección similar, cercanos al 80% (alto) y al 0% (bajo) para cada tratamiento. Los experimentos se llevaron a cabo en dos lotes adyacentes y consistieron en ocho rondas consecutivas de 15 minutos cada una, donde se ofreció el material momentos después de su cosecha, cortado y troceado con un tamaño aproximadamente de 10cm. En cada ronda se ofreció, a animales de igual edad y peso y tratados previamente de manera similar al experimento en parches, un kilogramo de peso húmedo por tratamiento, en total 4 kg por ronda (dos poblaciones y dos niveles de simbiosis). Tras 15 minutos de oferta, los comederos se retiraron y se pesó en húmedo el remanente, posteriormente se guardó el material restante de cada tratamiento para secar en horno y pesar en seco.

Experimento de oferta+base:

Este experimento se realizó solo en el estado vegetativo de las plantas (octubre de 2014) con un diseño similar en la preparación al experimento de oferta simple en estado reproductivo. El objetivo de este experimento era generar diferentes combinaciones de oferta y base en las que la base presentara el mismo o diferente nivel de simbiosis que la oferta. En cada comedero se separó el material de base, el cual podía ser olido, pero no visto ni consumido, y el material de oferta que podía ser olido, visto y consumido, mediante unas cestas de malla plástica insertadas en dicho comedero (Figura 3.1). Para generar contextos contrastantes, se utilizaron 500 g de material para la oferta y un kilo para la base, lo que generó una mezcla de diferentes olores entre tratamientos. La oferta se realizó de forma similar al anterior experimento pero en este caso los tratamientos fueron las combinaciones de oferta y base con y sin simbiosis.



Figura 4. 1 . Diagrama y foto del experimento *oferta+base*. En el experimento se prepararon cuatro combinaciones de los niveles de infección, alta y baja. La base proporciona el contexto y la oferta el material que el animal era capaz de consumir (el cajón tenía 45 cm de ancho y de largo, y 25 cm de alto).

Análisis estadístico

La preferencia del experimento en parches se analizó usando modelos mixtos. El consumo y la frecuencia de visita se utilizaron como variables dependientes, los bloques como variable aleatoria y los niveles de infección como variables fijas. Se analizó la autocorrelación temporal para detectar posibles efectos de tiempo y aprendizaje de los animales. La caracterización estructural (altura, densidad de macollos, biomasa ofertada) para la población Lucero y las características nutricionales (FDA, FDN, N, lignina) para las poblaciones de Lucero y Feliciano se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA). Para el análisis de la caracterización estructural se usó el nivel de infección como factor, y en la caracterización nutricional se usaron el nivel de infección y la población como factores, y se analizó la interacción entre ellos.

La preferencia en los experimentos en comederos se analizó mediante modelos mixtos. En el experimento de *oferta simple* la variable dependiente fue el consumo, la variable aleatoria el estado fenológico y la población y el nivel de simbiosis se utilizaron como variables independientes. En el experimento de *oferta+base* se usó el consumo como variable dependiente, los lotes como aleatoria y la oferta y la base como variables independientes, incluyendo la interacción. En ambos casos se estudió la autocorrelación temporal para detectar un posible efecto del tiempo (aprendizaje). La caracterización estructural para ambos estados fenológicos se analizó con un análisis de la varianza (ANOVA) donde la población y el nivel de simbiosis se utilizaron como factores y donde se incluyó la interacción entre ambos. Todos los análisis de este capítulo se realizaron con el programa estadístico R (Rcore Team 2013) y para los modelos mixtos se utilizó el paquete nlme (Pinheiro et al. 2016).

Resultados

Ninguna de las características morfológicas y estructurales de las plantas evaluadas en los experimentos revelaron efectos del nivel de infección del endófito ($p > 0,05$) (Cuadros 4.1 y 4.2). Tampoco se detectaron diferencias en las características nutricionales (FDA, FDN, lignina y nitrógeno) entre las plantas con alta y baja infección para las poblaciones de Lucero y Feliciano en ambos experimentos (Cuadro 4.3).

Cuadro 4. 1 Caracterización estructural de los parches de *L. multiflorum* con tres niveles de simbiosis usados en el experimento de parches (alto, medio y bajo) ($n = 4$ media \pm D.E.). ns corresponde a valores de $p > 0,5$.

Nivel de simbiosis	Altura (cm)	Biomasa g/m ²	Densidad de macollos (#Macollos/m ²)
Alto	51,7 \pm 3,1 ^{ns}	1997,1 \pm 179,4 ^{ns}	185,6 \pm 11,7 ^{ns}
Medio	51,0 \pm 3,1 ^{ns}	2103,7 \pm 143,6 ^{ns}	180,8 \pm 10,1 ^{ns}
Bajo	49,1 \pm 2,9 ^{ns}	2384,3 \pm 310,8 ^{ns}	198,1 \pm 6,6 ^{ns}

Cuadro 4. 2 Caracterización estructural de la biomasa de *L. multiflorum* para las dos poblaciones analizadas (Lucero y Feliciano) con baja (~0%) y alta (~80%) infección. Se muestran proporciones de tallos, macollos y vainas y láminas en dos estados fenológicos: vegetativo y reproductivo (media \pm D.E.; n = 3) ns corresponde a valores de $p > 0,5$.

	Lucero		Feliciano	
Nivel de simbiosis	Baja	Alta	Baja	Alta
Estado vegetativo				
Tallo	0,15 \pm 0,01 ^{ns}	0,13 \pm 0,03 ^{ns}	0,18 \pm 0,03 ^{ns}	0,14 \pm 0,02 ^{ns}
Macollo + vaina	0,37 \pm 0,02 ^{ns}	0,35 \pm 0,01 ^{ns}	0,36 \pm 0,03 ^{ns}	0,33 \pm 0,02 ^{ns}
Lámina	0,48 \pm 0,03 ^{ns}	0,52 \pm 0,02 ^{ns}	0,46 \pm 0,05 ^{ns}	0,54 \pm 0,04 ^{ns}
Estado reproductivo				
Tallo	0,40 \pm 0,01 ^{ns}	0,38 \pm 0,04 ^{ns}	0,38 \pm 0,02 ^{ns}	0,41 \pm 0,03 ^{ns}
Macollo + vaina	0,20 \pm 0,02 ^{ns}	0,23 \pm 0,03 ^{ns}	0,24 \pm 0,01 ^{ns}	0,22 \pm 0,01 ^{ns}
Hojas	0,39 \pm 0,01 ^{ns}	0,38 \pm 0,01 ^{ns}	0,38 \pm 0,01 ^{ns}	0,37 \pm 0,02 ^{ns}

Cuadro 4. 3 Caracterización química de la biomasa de *L. multiflorum* ofrecida en el experimento de parches (n= 3, media \pm S.E.) y en el de comederos (oferta simple) durante el estado reproductivo (n= 4, media \pm D.E.). Alto (80%) y bajo (0%) representan los niveles de infección del hongo en cada población (Lucero y Feliciano). En el experimento de parches solo se utilizó Lucero. Ns denota la ausencia de diferencias significativas entre poblaciones y/o niveles de infección ($p > 0,05$). FDA: fibras en detergente ácido, FDN: Fibras en detergente neutro, lignina, N: nitrógeno total. ns corresponde a valores de $p > 0,5$.

Tratamientos	FDA (%)	FDN (%)	Lignina (%)	N (%)
Experimento de parches				
Alto	38,1 \pm 1,8 ^{ns}	68,3 \pm 2,5 ^{ns}	4,19 \pm 0,2 ^{ns}	1,29 \pm 0,08 ^{ns}
Bajo	37,3 \pm 1,4 ^{ns}	65,2 \pm 2,4 ^{ns}	4,15 \pm 0,2 ^{ns}	1,07 \pm 0,05 ^{ns}
Experimento en comederos				
Lucero Bajo	42,4 \pm 1,0 ^{ns}	71,5 \pm 0,6 ^{ns}	5,76 \pm 0,41 ^{ns}	1,53 \pm 0,04 ^{ns}
Lucero Alto	41,8 \pm 0,9 ^{ns}	71,0 \pm 1,3 ^{ns}	5,25 \pm 0,15 ^{ns}	1,54 \pm 0,07 ^{ns}
Feliciano Bajo	42,6 \pm 0,5 ^{ns}	72,2 \pm 1,1 ^{ns}	5,50 \pm 0,09 ^{ns}	1,58 \pm 0,05 ^{ns}
Feliciano Alto	41,7 \pm 0,3 ^{ns}	72,3 \pm 0,9 ^{ns}	6,50 \pm 0,82 ^{ns}	1,45 \pm 0,19 ^{ns}

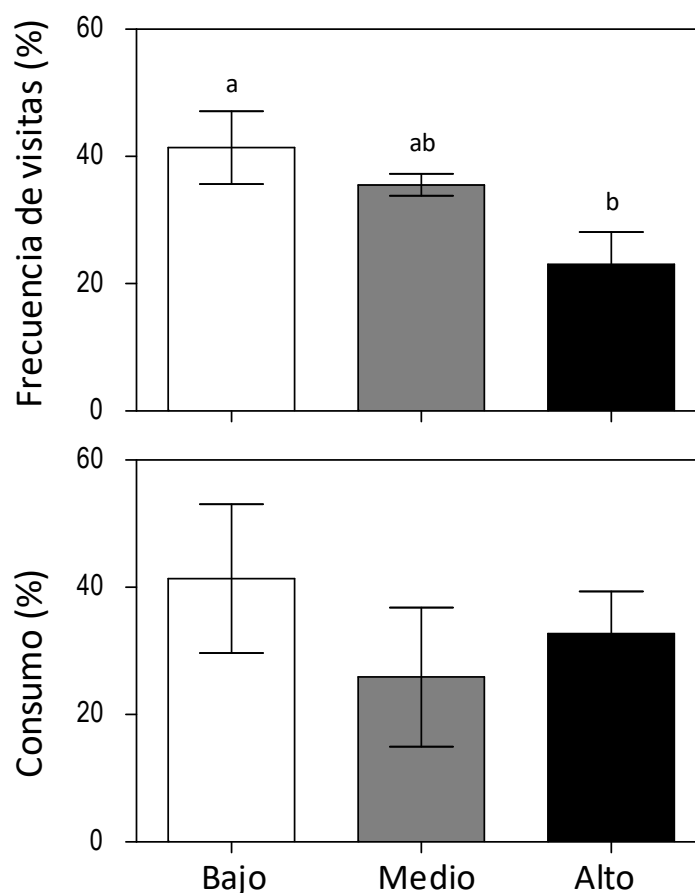


Figura 4. 2 Preferencia de los animales por parches de *L. multiflorum* con diferente nivel de simbiosis: bajo, medio y alto (0%, 40%, 80%). Arriba: la frecuencia de visitas a cada parche expresada como porcentaje de las visitas totales. Abajo: el consumo estimado como la fracción de biomasa removida de cada parche. Letras diferentes señalan diferencias significativas ($p < 0,05$).

El experimento en parches mostró una mayor frecuencia de visitas en los tratamientos con baja infección (40% total de visitas) (Figura 4.2, $F_{3,9} = 10,1$; $p = 0,003$), en contraste con los de alta mayor infección (25% total de visitas). Sin embargo, estas diferencias no se detectaron en el consumo ($p = 0,77$) (Figura 4.2).

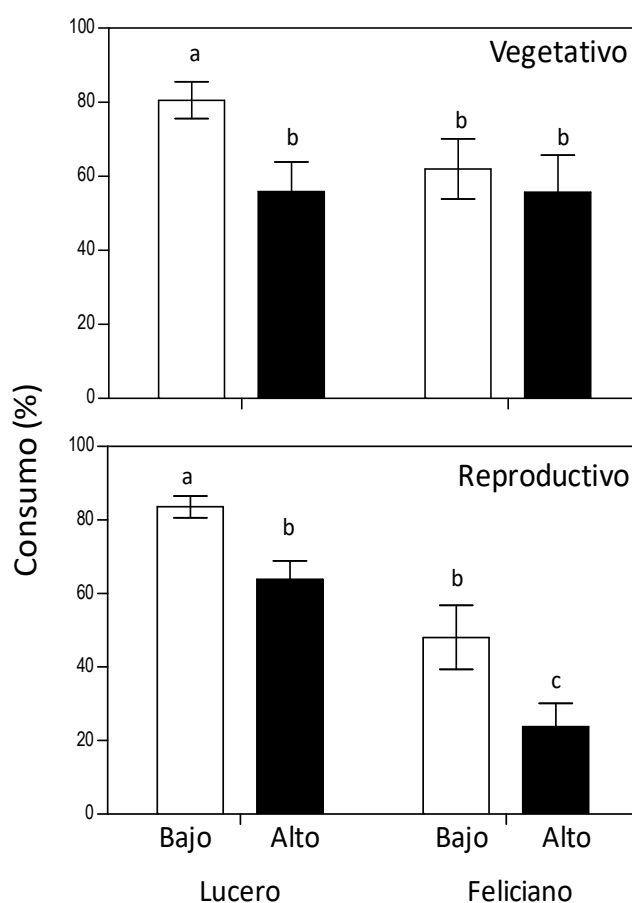


Figura 4. 3 Consumo por parte de los animales de las dos poblaciones de *L. multiflorum* (Lucero y Feliciano) con bajo (~0%) y alto (~80%) nivel de simbiosis, durante los estados vegetativo y reproductivo. El consumo se estimó como la fracción de biomasa removida de cada comedero. Letras diferentes reflejan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los experimentos de *oferta simple* en comederos también revelaron una mayor preferencia por *L. multiflorum* con baja infección con respecto a los que presentaban alta infección ($F_{1-61} = 11,9$; $p = 0,001$) (Figura 4.3). Además, se observó una mayor preferencia en las poblaciones de Lucero sobre Feliciano ($F_{1-61} = 17,9$; $p > 0,001$) pero este efecto no interactuó con el nivel del endófito ($F_{1-61} = 0,5$; $p = 0,48$) (Figura 4.3).

En el experimento de *oferta+base* también se observó una mayor preferencia por el forraje con baja infección ($F_{1-24} = 5,1$; $p = 0,03$) que no varió con la identidad de la base ($F_{1-24} = 0,14$; $p = 0,71$) (Figura 4.4)

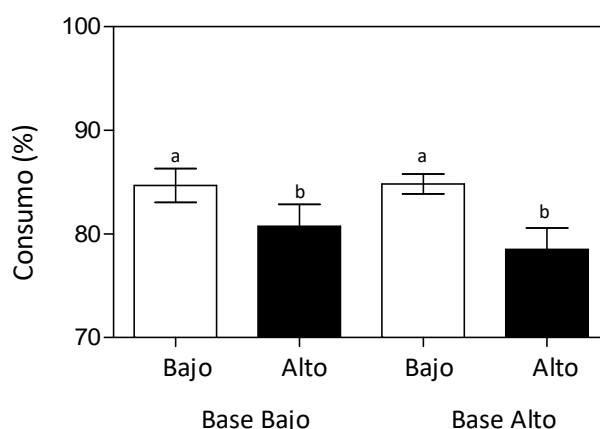


Figura 4. 4 Consumo animal de la oferta de biomasa de *L. multiflorum* con bajo (~0%) y alto (~80%) nivel de infección con hongos endófitos (barras blancas y negras respectivamente) ofrecida en canastas dentro de un comedero con base de material de la misma especie, con alto o bajo nivel de simbiosis. La biomasa de la base podía ser olida y vista pero no consumida por el animal. El consumo se estimó como biomasa removida. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Discusión

Los resultados mostraron que la simbiosis con hongos no tóxicos del género *Epichloë* reducen la preferencia de consumo del herbívoro doméstico en *Lolium multiflorum*. Las tres aproximaciones implementadas en este estudio confirmaron una preferencia consistente por las plantas de *L. multiflorum* sin endófito. Este cambio en la preferencia no mostró una relación detectable con cambios en la biomasa, en la morfología o en características nutricionales y de digestibilidad del forraje. Tampoco pudimos detectar una influencia de factores olfativos con las diferentes mezclas de ofertas (experimento *oferta+base*). Debido a la importancia de esta especie como forraje de invierno, y a que estas poblaciones presentan naturalmente altos niveles de infección con la simbiosis, estos resultados pueden tener una gran relevancia tanto ecológica como económica ya que las plantas con simbiosis podrían tener un impacto negativo sobre la producción animal.

Nuestros resultados muestran que la preferencia de los herbívoros por las plantas sin simbiosis no está relacionada con diferencias morfológicas o nutricionales del hospedante. Varios estudios han evaluado cómo la simbiosis puede afectar a las características morfológicas y nutricionales del hospedante (Olivera et al. 2004, Zabalgogezcoa et al. 2006, Rasmussen et al. 2008, Johnson et al. 2012, Soto-Barajas et al. 2015) pero hasta el momento no se había estudiado el potencial impacto sobre el consumo de herbívoros domésticos. Nuestros resultados se suman a lo mostrado por Olivera et al. (2004) y Soto-Barajas et al. (2015), quienes no encontraron una relación entre el nivel de la simbiosis y cambios en los caracteres morfológicos (mayor o menor producción de biomasa). Por otro lado, los efectos de la simbiosis sobre los caracteres nutricionales han sido menos estudiados y presentan resultados variables según la especie del hospedante. Se ha documentado una menor FDN y lignina en plantas con endófitos de *Festuca rubra* y *Lolium perenne* con respecto a sus congéneres sin endófito, lo que aumentaría su digestibilidad y las haría potencialmente más preferidas (Zabalgogezcoa et al. 2006,

Rasmussen et al. 2008, Soto-Barajas 2015). No obstante, también se ha documentado la ausencia de cambios en los parámetros nutricionales de *Schedonorus arundinaceus* (Johnson et al. 2012). Nuestros estudios muestran que en *L. multiflorum* tampoco se registra tal variación aunque la preferencia consistente por las plantas sin el endófito sugiere que la simbiosis puede estar involucrada en algún mecanismo no incluido en el conjunto de variables analizado.

La variación en la producción y emisión de volátiles producto de la simbiosis ha sido propuesta como un mecanismo de protección contra herbívoros (García Parisi et al. 2014, Li et al. 2014). Pero aún hace falta más evidencia que evalúe esta capacidad defensiva y cuán generalizada está entre las distintas especies que forman esta simbiosis. En este sentido, la composición y la intensidad de la emisión de volátiles varía entre plantas con y sin simbiosis, pero la magnitud y la dirección de esta variación cambia dependiendo de la especie (García Parisi et al. 2014, Li et al. 2014). En nuestro caso con vertebrados, en el experimento de *oferta+base*, diseñado con la intención de detectar la eventual influencia de la emisión de compuestos volátiles, no detectamos diferencias entre las mezclas de ofertas presentadas, aunque sí se mantuvo la preferencia por las plantas sin endófito al igual que en el resto de los experimentos, sugiriendo que no hay una diferencia en la producción de volátiles que repela al herbívoro o que esta no tiene la intensidad suficiente para superar el efecto de los emitidos por la oferta.

Nuestros resultados también revelaron un efecto del genotipo del hospedante sobre la preferencia del herbívoro independiente del nivel de simbiosis y del estado fenológico. En las dos fechas en las que se realizó el experimento de *oferta simple* (material en estado vegetativo y reproductivo), los animales consistentemente prefirieron la población de Lucero frente a la de Feliciano. Esta diferencia en la preferencia entre poblaciones de una misma especie está ampliamente tratada en la literatura, aunque generalmente se la ha relacionado con variaciones en las características nutricionales (por ejemplo: compuestos secundarios, contenido mineral, o de lignina) (Caño et al. 2009). Como no encontramos diferencias en muchas de estas características, variaciones en la producción de alcaloides o de otros metabolitos producidos por el hongo entre las dos poblaciones pueden haber modificado la preferencia del ganado (Rasmussen et al. 2009; Reed et al. 2011; Dupont et al. 2015; Helander et al. 2016). Es por esto que nuestros resultados apoyan la idea de que diferentes poblaciones del hospedante pueden modificar la preferencia en diferente grado (Rasmussen et al. 2009, Crawford et al. 2010; Johnson et al. 2012). Por lo que la selección de la población puede ser crítica para optimizar el uso de esta simbiosis como forraje.

Como conclusión, nuestros resultados agregan una nueva evidencia de la importancia que tiene esta simbiosis en la interacción entre pastos y herbívoros. Concretamente encontramos que: (1) la preferencia del ganado se ve afectada por la simbiosis a pesar de no ser clínicamente tóxica, (2) este efecto se mantuvo constante en las dos poblaciones estudiadas con preferencia intrínseca diferente, (3) la diferente preferencia no estaba relacionada con características morfológicas o nutricionales íntimamente unidas a una diferente palatabilidad. Aún resta comprender cuáles son los mecanismos responsables de la menor preferencia por las plantas con el hongo y para evaluar si este efecto desalentador del consumo podría afectar la producción secundaria.

Capítulo V: Resistencia, cambios en la preferencia de invertebrados mediada por la simbiosis

Introducción

Como se discutió en el capítulo anterior, los herbívoros tienen una gran capacidad de selección de su dieta (Ehrlich y Raven 1964, Feeny 1976, Thompson et al. 1988). En el caso concreto de los pastos y los herbívoros invertebrados, las características nutricionales de la planta así como las defensas químicas (por ejemplo: alcaloides y volátiles) condicionan la preferencia del herbívoro. Los pastos parecen basar su estrategia principal en la rápida compensación del tejido removido (McNaughton 1983) en lugar de defensas químicas como en otras familias de plantas (Karban y Baldwin 2007). Sin embargo, cuando el pasto hospeda al hongo *Epichloë* adquiere nuevos mecanismos de defensas químicas de resistencia producidas por el hongo, como los alcaloides. En el capítulo anterior, se mostró que plantas de una misma población, con y sin endófitos, cultivadas a campo no presentaban diferencias nutricionales, lo que sugiere que los efectos sobre la preferencia estarían relacionados a la producción de metabolitos de origen fúngico que funcionan como defensas químicas.

Los mecanismos de resistencia que aporta la simbiosis están relacionados con la producción de alcaloides tóxicos, en el caso de herbívoros invertebrados son *lolinas* fundamentalmente, (Leuchtman et al. 2000, Schardl et al. 2012) o con otros mecanismos como la emisión de volátiles (García Parisi et al. 2014). Estos mecanismos pueden actuar sobre la dinámica poblacional de los herbívoros (afectando el número de pupas) o alterando su preferencia (Crawford et al. 2010, García Parisi et al. 2014, Ueno et al. 2015). A su vez, ambos mecanismos pueden ser afectados por situaciones de estrés hídrico aunque no necesariamente en la misma dirección. Mientras que un estudio reciente mostró una disminución en la producción de alcaloides en situaciones de estrés hídrico para *Festuca alta* (Helander et al. 2016), Bultman y colaboradores (2004) previamente mostraron que ante situaciones de daño, la resistencia contra herbívoros invertebrados de las plantas con el endófito aumentaba.

El objetivo de este capítulo es analizar y determinar si hay patrones de respuesta a la presencia del endófito en la preferencia de un herbívoro invertebrado *Rhopalosiphum padi* en combinación con la acción separada de estrés por sequía y por defoliación. Nuestra hipótesis es que el patrón de preferencia de los herbívoros invertebrados sobre plantas de *Lolium multiflorum* variará por la presencia de esta asociación (*Epichloë occultans*) y su interacción con el contexto ambiental (sequía y defoliación). Nuestra predicción es que habrá una mayor preferencia de los áfidos por las plantas sin esta asociación y que este efecto se verá afectado negativamente en situaciones de estrés ambiental que borrarán las diferencias de preferencia de los áfidos.

Metodología

Se realizaron dos experimentos de preferencia, uno con plantas vivas y otro con material cortado. Para ambos experimentos se cultivaron 84 plantas (48 para el experimento en arenas y 36 para el experimento en placa de Petri, la mitad E+ y la otra mitad E-) en

invernáculo durante 4 meses momento en que se realizó midió la preferencia. Se utilizaron en macetas de 1 litro y no se aplicaron ni pesticidas ni fertilizantes. Tras dos meses se aplicaron los tratamientos de sequía y corte y un mes más tarde las plantas se limpiaron mecánicamente de herbívoros y aisladas con una malla que no permitía el paso de invertebrados. Los áfidos fueron recolectados en el campo experimental del IFEVA y posteriormente se criaron en cámara a 21°C (± 1), un fotoperiodo de L16:D8 h, y radiación de 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ sobre plantas de trigo (*Triticum aestivum*), donde se controló que no hubiera presencia de parasitoides.

El primero fue un experimento de preferencia de doble oferta (cafetería) en arenas donde se ofreció durante 24h a 10 áfidos adultos un par de plantas con y sin simbiosis (Figura 5.1) (basado en: Castle et al. 1998 e Ingwell et al. 2012). El segundo experimento se realizó paralelamente bajo los mismos tratamientos pero con el material vegetal cortado y ofrecido en cajas de Petri, durante 1 hora y a un solo individuo (áfido adulto) (basado en: Clement et al. 1992, Crawford et al. 2010). En ambos experimentos se ofertó tres tipos de material: control, sequía o corte.

Para generar los tratamientos de simbiosis en los experimentos se usaron semillas con alto índice de infección (aproximadamente 100%) y semillas sin simbiosis (0%). Como se trabaja a nivel de planta y para corroborar que la planta presentaba o no simbiosis se analizó la semilla antes de sembrarla. Las semillas se cortaron en dos partes, la parte con el embrión se dejó germinar en una cámara mientras que la parte restante se usó para determinar la presencia de la simbiosis, para lo que fue tratada con NaOH y teñida con Rosa de Bengala (Bacon y White 1994a, 1994b). Las semillas que contenían al hongo se usaron para obtener una planta con simbiosis, las que no presentaron simbiosis fueron desechadas. Para obtener las plantas sin simbiosis, se partió de las semillas con baja infección y se realizó el mismo procedimiento, pero esta vez se seleccionaron solo las que no estaban asociadas con *Epichloë* (basado en Moore et al. 2015).

El tratamiento de sequía se aplicó a los dos meses de crecimiento. Consistió en suspender el riego de las plantas durante 10 días, lo que redujo el contenido volumétrico de agua del suelo a valores aproximados del 10%, mientras que los controles se mantuvieron en un 30% (Figura 5.1). Transcurridos los diez días se retomó el riego normalmente, obteniendo un contenido de agua similar entre todos los tratamientos a los pocos días de finalizar la sequía. Durante el periodo de sequía y días posteriores, se midió el contenido volumétrico de agua en cada maceta cada 2 días, con un TDR (AT Soil Moisture Kit Type HH2, Delta-t divic). Las mediciones se mantuvieron a lo largo del resto del experimento con menor frecuencia para comprobar que todas las plantas tenían un riego homogéneo.

El tratamiento de corte consistió en un evento donde se removió el 50% de la biomasa aérea de cada planta luego de ocho semanas de cultivo (Massara Paletto et al. 2010). Para esto se realizó una calibración previa con plantas de la misma población entre altura (hoja más larga) y biomasa. Para obtener la calibración se midieron 10 plantas con simbiosis y 10 plantas sin simbiosis, cortadas a diferentes alturas 0%, 25%, 50%, 75% y 100% para estimar el promedio de masa removida y la relación entre el peso y la altura mediante un ajuste lineal ($R^2 = 0,98$).

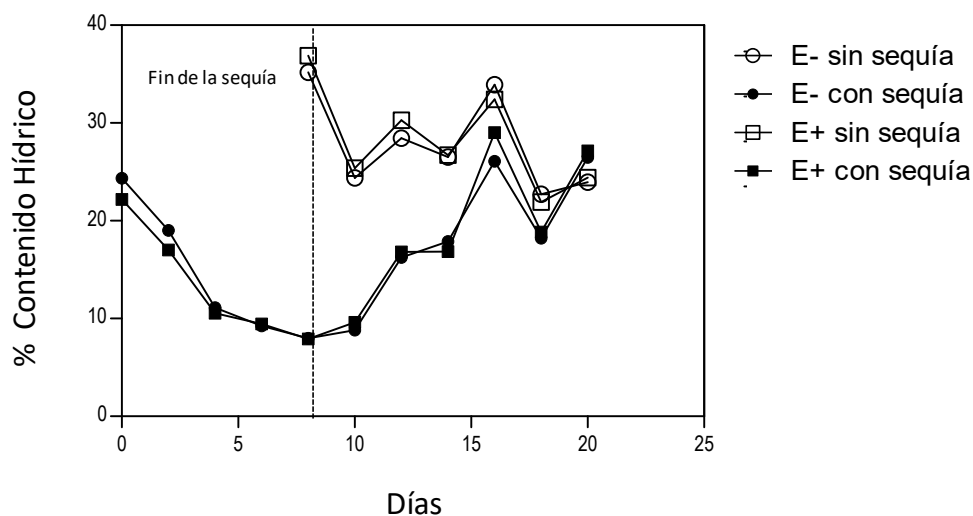


Figura 5. 1 Variación del contenido hídrico del suelo para plantas con tratamiento de sequía. 0 = inicio de tratamiento de sequía, la línea puntuada marca el reinicio del riego.

Experimento con plantas vivas

En este experimento se ofrecieron en días consecutivos ocho pares (compuestos por una planta E+ y otra E-) de plantas vivas por tratamiento durante 24 horas a grupos de diez áfidos, donde no se usaron ciclos de luz y se intentó en lo posible de eliminar diferencias de luces (sombras). Se estimó la preferencia a partir de la posición donde se encontraban tras el periodo de oferta (en la planta E+, en la planta E- o en ninguna). La oferta se realizó a los dos meses de la aplicación de los tratamientos (sequía, corte o control). En los tres casos la oferta se realizó usando una planta con y una sin simbiosis y las ocho arenas se compararon en simultáneo, entre oferta y oferta de tratamientos se limpiaron las arenas con alcohol (etanol 70%) y se enjuagó con agua, posteriormente se dejó secar al aire. Como oferta de los tratamientos se usó una hoja de cada planta (E+ y E-) que atravesaba la arena manteniéndose ambas equidistantes al punto de entrada de los áfidos (se utilizaron láminas de *L. multiflorum* lo más similares posible tanto en tamaño como en edad). La arena donde se realizó la oferta tenía forma cilíndrica, una modificación de la usada por Castle y colaboradores (1998) e Ingwell y colaboradores (2012) (Figura 5.2).

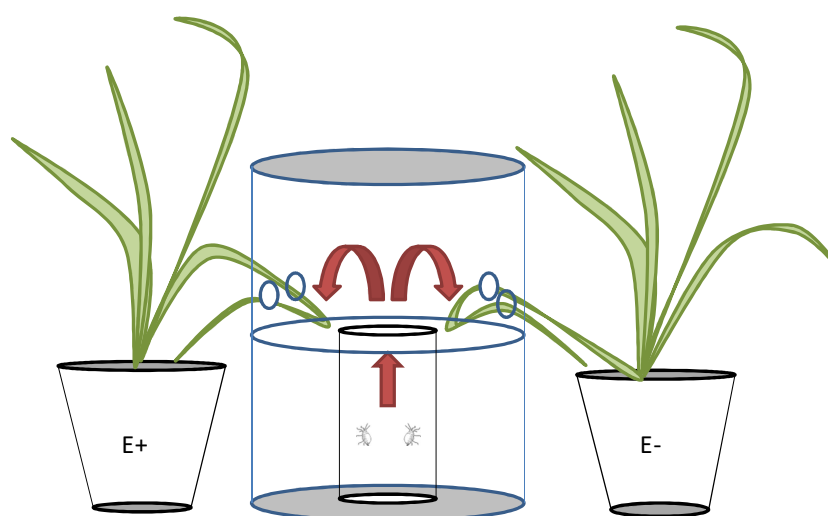


Figura 5. 2 Esquema del experimento de preferencia con plantas vivas. Las arenas presentaban una base central ubicada en la zona media del cilindro con un punto de entrada para los áfidos en la parte central de la arena y cuatro aberturas en las paredes del cilindro que permitían la entrada y salida de las hojas ofertadas. Las arenas tenían 12 cm de alto y 10 cm de diámetro, la base central se encontraba a 6 cm. El recorrido de los áfidos hasta el punto de entrada era de 3cm.

Experimento con material cortado

Se usaron placas de Petri como arenas (basado en: Clement et al. 1992 y Crawford et al. 2010). El material que se ofreció fue cortado en el momento inmediatamente previo a la oferta y se usaron los mismos tratamientos que en el experimento anterior. En este caso el tiempo de oferta fue de 1 hora y se utilizó un único áfido que se situó en la parte media de la placa y, tras el tiempo de oferta, se midió la preferencia como lugar en el que se encontraba: planta E+, planta E- o en ninguna. Para cada tratamiento de corte, sequía o control se usaron seis pares de plantas (E+ y E-) de las cuales se usaron siete pares de hojas por par de plantas. El material utilizado para la oferta tenía 3 cm de largo y fue lo más parecido posible (ancho y edad de la hoja) (Figura 5.3). Todos los cortes se realizaron simultáneamente en cada planta (una ventana de pocos minutos entre el primer corte y el último) y luego se realizaba la oferta

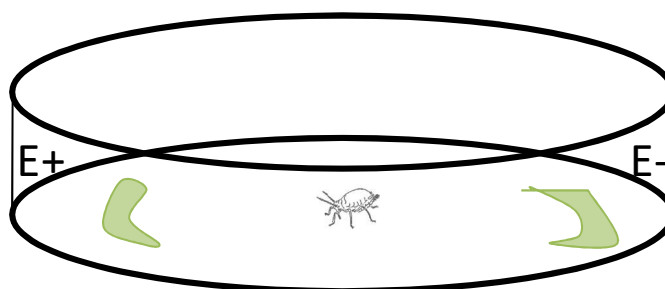


Figura 5. 3 Esquema del experimento de preferencia con material cortado, E+ corresponde al material proveniente de plantas con infección y las E- material de las plantas no infectadas.

Análisis estadísticos

Para ambos experimentos se comparó la proporción de áfidos que respondió a la presencia de la simbiosis en los diferentes tratamientos usando un modelo lineal generalizado asumiendo distribución binomial con transformación “logit” (R Development Core Team 2013). Los áfidos que no se encontraron en ninguna hoja de las plantas ofrecidas se consideraron que no respondían a la oferta y no se tomaron en cuenta en el análisis.

Resultados

Los resultados del experimento con plantas vivas no mostraron preferencia en función de la presencia o no del endófito en las plantas control (ni defoliadas ni con sequía) ($\chi^2 = 3,34$; $p = 0,06$) ni en las defoliadas ($\chi^2 = 0,89$; $p = 0,34$). En cambio, sí se observó una diferencia significativa ($\chi^2 = 11,1$; $p = 0,0008$) en la preferencia de las plantas que habían experimentado sequía, ya que dentro de este grupo, los áfidos prefirieron a las que portaban el endófito (Figura 5.4).

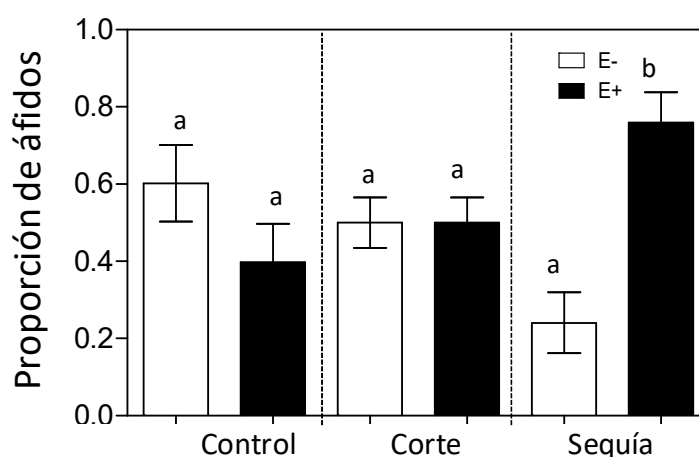


Figura 5. 4 Experimento en plantas vivas. Se muestra el promedio de la proporción de áfidos por planta en los diferentes tratamientos. En blanco plantas sin simbiosis y en negro plantas con simbiosis. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Los resultados del experimento en cajas de Petri con láminas cortadas no mostraron diferencias significativas en la preferencia por las plantas con y sin simbiosis en ninguna de las tres condiciones (control: $\chi^2 = 0,007$; $p = 0,9311$; corte: $\chi^2 = 0,517$; $p = 0,47$; sequía: $\chi^2 = 0,67$; $p = 0,4$) (Figura 5.5).

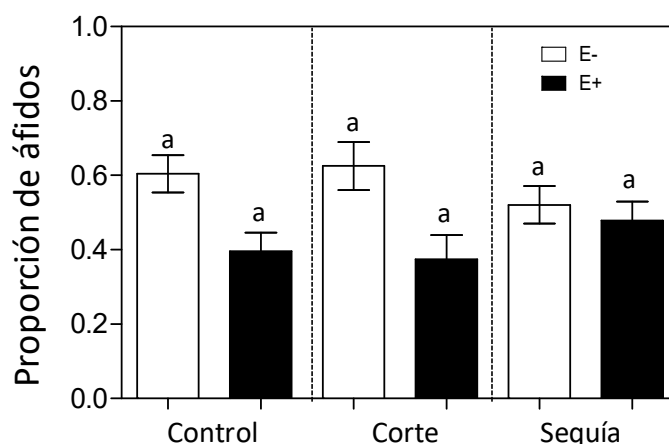


Figura 5. 5 Experimento en placas de Petri, con láminas cortadas. Se muestra el promedio de la proporción de áfidos en una u otra lámina. En blanco plantas sin simbiosis y en negro plantas con simbiosis. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Discusión

Contrario a lo encontrado en el capítulo anterior para herbívoros vertebrados, la simbiosis no desalentó el consumo de los herbívoros invertebrados (*R. padi*). De las 14 comparaciones independientes incluidas en las aproximaciones en planta viva y en placa de Petri, para cada tratamiento (control, corte y sequía), solo se observó una diferencia en la preferencia en situaciones de sequía en plantas vivas, donde aumentó la preferencia por las plantas E+. Esto sugiere que la presencia de la simbiosis puede tener un efecto diferente sobre la preferencia de los herbívoros invertebrados y vertebrados, si se compara con los resultados observados en el capítulo anterior para herbívoros vertebrados. Por lo tanto, la defensa que otorga la simbiosis contra invertebrados descrita por otros autores (ej. Bultman et al. 2003, 2004, Crawford et al. 2010, García Parisi et al. 2014) debe estar asociada con otros mecanismos como por ejemplo afectando la dinámica poblacional del herbívoro invertebrado (Ueno et al. 2015). Algunos autores proponen que la resistencia contra áfidos aportada por la simbiosis puede depender de la identidad de la planta hospedante y de la disponibilidad de recursos que experimenta. En relación con la identidad de la planta, Crawford y colaboradores (2010) mostraron una capacidad de resistencia contra herbivoría de invertebrados que varía dependiendo de la especie del hospedante y del herbívoro: cinco de diez especies de pastos mostraron menor daño en las plantas con endófito, *Agrostis perennans*, *Elymus virginicus*, *Poa alsodes*, *Poa autumnalis*, *Poa silvestris* y solo *P. alsodes* y *P. autumnalis*, para los dos herbívoros usados, *S. frugiperda* y *S. americana*. En relación con la disponibilidad de recursos, Bultman y colaboradores (2004) mostraron que variaciones en la disponibilidad de nutrientes aumentaban la diferencia de infestación por áfidos entre las plantas con y sin endófito. A su vez, Yule y colaboradores (2010) encontraron que la sequía aumentaba el efecto repelente de la simbiosis contra áfidos, lo que no ocurría cuando la disponibilidad de agua era abundante. Concretamente, en *L. multiflorum* se ha observado una mayor preferencia de áfidos por las plantas sin endófitos (Miranda et al. 2011, García Parisi et al. 2014, Ueno 2015). No obstante, los resultados de esta tesis no apoyan estas evidencias excepto en situaciones de estrés hídrico donde las plantas con endófito resultaron más preferidas que las que no lo portaban.

Como se discutió en el capítulo anterior, los mecanismos que pueden ofrecer resistencia contra áfidos, producción de volátiles y/o alcaloides (Leuchtman 2000, Bultman et al. 2003, García Parisi et al. 2014) pueden verse afectados por el corte (Bultman et al. 2004, Li et al. 2014). A pesar de este posible efecto nuestros experimentos mostraron que el corte no provocó ningún cambio sobre la preferencia de los áfidos, aun así no se puede descartar totalmente un posible efecto de resistencia ya que varios trabajos sugieren que el efecto de la simbiosis sobre los áfidos está relacionado con una reducción en el desempeño de la población de áfidos (Bultman et al. 2003, Meiser et al. 2006, Crawford et al. 2010, Miranda et al. 2011, Ueno et al. 2014) y no con el cambio en el comportamiento (preferencia), contrario a lo sugerido en la literatura (Crawford et al. 2010, García Parisi et al. 2014).

Por otro lado, el tratamiento de sequía sí mostró un efecto sobre la preferencia de los áfidos sobre las plantas con simbiosis en el experimento de plantas vivas (no se detectó en el experimento de láminas cortadas). Algunos trabajos proponen que los beneficios de la simbiosis pueden verse afectados por la sequía, observándose una menor biomasa de raíces (Morse et al. 2002, Rudgers et al. 2009b) y una menor capacidad en la producción de alcaloides en *L. perenne* y *F. arundinacea* (Hahn et al. 2008, Helander et al. 2016). Con estos antecedentes, y bajo la hipótesis de que el hongo desactiva otras vías metabólicas de defensa contra herbívoros succionadores (Saikkonen et al. 2013), la mayor preferencia que observamos en las plantas con simbiosis que experimentaron sequía podría estar relacionada con un efecto negativo de la sequía sobre la capacidad del hongo de producir los alcaloides necesarios para defender a la planta hospedante, y dejándola más expuesta.

En conclusión, la simbiosis entre *Lolium multiflorum* y *Epichloë occultans* puede modificar la preferencia de los herbívoros domésticos como vimos en el capítulo anterior, pero los resultados sugieren que la simbiosis no afecta negativamente la preferencia de los herbívoros invertebrados, al contrario, los resultados mostraron un efecto del estrés por sequía sobre las capacidades defensivas de la simbiosis dejando más susceptibles a las plantas hospedantes frente a la herbivoría de los áfidos.

Capítulo VI: Tolerar, efecto de la simbiosis sobre la capacidad de compensar la biomasa removida por herbivoría

Introducción

Además de las estrategias de evasión de la herbivoría abordadas en los capítulos previos, los pastos en particular presentan la capacidad de aumentar su tasa de crecimiento por unidad de biomasa frente a la remoción de tejido. Estas respuestas se conocen como respuestas compensatorias y han recibido gran atención en el pasado (McNaughton 1983, Oosterheld y McNaughton 1991, Agrawal 2000). Como se mencionó en los capítulos previos, en el caso de los pastos templados surge una tercera alternativa: la defensa por asociación simbiótica con hongos del género *Epichloë*. Si bien los efectos de esta simbiosis desalentando el consumo han recibido gran atención (Clay y Schardl 2002, Leuchtman et al. 2000, Schardl 2000, Belesky y Fedders 1996), sus efectos sobre la tolerancia a la defoliación están bastante menos estudiados.

Los pastos han sido considerados tradicionalmente tolerantes debido a su gran capacidad de dispersión y de crecimiento (Coughenour 1985, Karban y Baldwin 2007) además de la poca capacidad que tienen para generar compuestos secundarios. Es por esto que la incorporación de la simbiosis con hongos del género *Epichloë* implicaría la adquisición de un nuevo sistema defensivo que varía en eficacia (nivel de toxicidad) y en tipo de defensa (tolerancia o resistencia). Hay pocos trabajos que describen una posible relación de la simbiosis con mecanismos defensivos de tolerancia como crecimiento compensatorio y/o redistribución de los recursos (hacia la biomasa subterránea o reproductiva) y estos presentan resultados contrastantes, tanto para *Festuca alta* como para *Raigrás perenne*, el efecto de la simbiosis sobre la capacidad de tolerar el material removido depende del genotipo del hospedante (Belesky y Fedders 1996, Cheplick 1998). Una posible causa, en *Festuca alta*, del compromiso entre el mantenimiento de la simbiosis y la compensación del material removido tras el corte puede estar relacionada con una inversión de recursos en la producción de alcaloides que limite el crecimiento en comparación con las plantas E- (Bultman et al. 2004). Determinar el papel de la simbiosis en la capacidad de los pastos de tolerar la pérdida de tejido fotosintético nos permitiría entender su papel en la relación planta herbívoro y su gran variabilidad en la naturaleza, tratada en el capítulo II de esta tesis.

La capacidad de tolerar la herbivoría puede depender de la disponibilidad de recursos, por ejemplo, de agua. Los modelos predominantes presentan predicciones contrastantes, por un lado se propone que en situaciones de abundancia de recursos las plantas crecerán cerca de su potencial genético. Por lo tanto, la capacidad de que luego de un evento de defoliación el tejido remanente experimente aumentos en su tasa de crecimiento que compensen el material perdido es muy reducida (Ferraro y Oosterheld 2002). Por otro lado, en situaciones donde la planta no sufre restricciones en los recursos que limiten la capacidad de compensar la biomasa removida tiene más capacidad de compensar (Maschinski y Whitham 1989, Hawkes y Sullivan 2001).

Tampoco está claro cómo la simbiosis puede modificar el efecto de la sequía sobre la capacidad de tolerar la herbivoría, por un lado puede disminuir el impacto de la sequía al ser capaz de conferir resistencia contra ella (Morse et al. 2002, Hahn et al. 2008), pero por otro lado en situaciones de estrés hídrico, y tras la remoción de biomasa, el mantenimiento del hongo podría competir con la asignación de nutrientes al crecimiento acentuando el efecto negativo de la sequía sobre la capacidad de compensar del pasto.

En este capítulo estudiamos el papel de la simbiosis sobre la tolerancia del hospedante frente a la herbivoría, y si los efectos de la simbiosis pueden verse afectados por situaciones de estrés ambiental como la disponibilidad hídrica. Nuestra hipótesis es que la asociación entre la planta y el hongo endófito modifica la tolerancia a la defoliación al competir con el crecimiento por los recursos tras la defoliación. No obstante, esta competencia se puede ver enmascarada en situaciones de estrés hídrico por la tolerancia a la sequía que aporta esta asociación. Esperamos encontrar una menor capacidad de compensar el material removido (o en otros mecanismo de tolerancia) tras el corte en plantas con endófitos en comparación con las plantas sin hongos endófitos. Además, esperamos que este efecto negativo sobre la tolerancia no se observe en situación de sequía.

Metodología

Para alcanzar los objetivos planteados se realizó un experimento bajo condiciones controladas, en invernáculo, y en plantas de *L. multiflorum* (población Lucero), con y sin endófito, a las que se sometió a corte en diferentes contextos de sequía. Las plantas fueron cultivadas en macetas individuales de un litro a las que no se les agregó ningún fertilizante ni pesticida y se realizó un control mecánico de plagas. La metodología de cultivo fue similar a la descrita en el capítulo anterior.

El experimento tuvo un diseño factorial completo, con tres factores (simbiosis, corte mecánico y sequía) y dos niveles por factor (con y sin simbiosis, con y sin corte, con y sin sequía). El experimento duró 20 semanas con un total de 120 plantas. Las plantas se cultivaron durante dos meses, tras los cuales se aplicaron los tratamientos de sequía y corte. Luego de la aplicación de los tratamientos se evaluó el crecimiento de las plantas mediante 5 cosechas de biomasa aérea y subterránea. Para generar los tratamientos de semillas, sequía y corte se utilizó la misma metodología que en el capítulo anterior.

Variables de respuesta y análisis estadístico: La capacidad de cada planta de recuperarse luego del corte (tolerancia) se evaluó durante las 12 semanas posteriores al corte. Las mediciones se realizaron a lo largo de 5 fechas: a los 0, 7, 15, 30 y a los 60 días después del corte. La fecha 0 se usó como línea de base y debido a diferencias en la fecha de maduración de semillas, la última fecha solo se usó para la estimación de la producción de semillas pero no se incluyó en el análisis de la biomasa. Se utilizaron 3 plantas de cada tratamiento en cada fecha a las que se les midió el número de macollos, la biomasa aérea, la biomasa de raíces (estos últimos correspondieron a la tesis de grado de Agustina Torres 2016), la relación tallo-raíz y la producción final de semillas (solo en la última fecha). Con las medidas de biomasa se calculó la tasa de crecimiento relativa (TCR), es decir la tasa de crecimiento por unidad de tiempo, y con la producción de semillas se estimó el número

promedio de semillas y el esfuerzo reproductivo (biomasa reproductiva/biomasa de la planta) por tratamiento.

Para medir la TCR se usaron las fórmulas presentadas a continuación:

$$TCR = \frac{\text{Media}(\ln \text{Biomasa}_{t1}) - \text{Media}(\ln \text{Biomasa}_{t0})}{t1 - t0}$$

$$V(TCR) = \frac{\text{VAR}(\ln \text{Biomasa}_{t1}) - \text{VAR}(\ln \text{Biomasa}_{t0})}{(t1 - t0)^2}$$

Donde $\ln \text{Biomasa}_{t1}$ es el logaritmo de la biomasa aérea en el tiempo uno y $\ln \text{Biomasa}_{t0}$ es el logaritmo de la biomasa en el tiempo cero, $t1$ y $t0$ corresponden al valor del tiempo uno y tiempo cero. Var, en la segunda ecuación, hace referencia a la varianza.

Para analizar los efectos de los tratamientos sobre la producción de biomasa, la tasa de crecimiento, la TCR, la producción de semillas y el esfuerzo reproductivo se calcularon dichos efectos respecto del control mediante la d corregida de Cohen para conjuntos de datos con pocas repeticiones. Para esto se analizó la interacción entre el tiempo y la biomasa, que al no ser significativa esta interacción (todos los tratamientos se veían afectados de igual forma por el tiempo) permitió utilizar cada fecha de recolección como una repetición del tratamiento independiente, obteniendo el efecto de cada tratamiento en cada fecha de recolección respecto de su control.

La d se calculó con las siguientes fórmulas:

$$d = \frac{(\bar{X}_t - \bar{X}_c)}{S} * J$$

$$J = 1 - \frac{3}{4(N_e + N_E - 2) - 1}$$

$$v_d = \frac{N_e + N_E}{N_e * N_E} + \frac{d^2}{2(N_e + N_E)}$$

Donde \bar{X}_t es la media de tratamiento, \bar{X}_c es la media del control, N_E es el tamaño muestral del experimento y N_e el tamaño muestral del control.

Para analizar los datos la relación tallo-raíz se usó un análisis de la varianza (ANOVA) en el que la sequía, corte y simbiosis fueron las variables independientes, cuando hubo diferencias significativas se compararon las medias mediante pruebas de Tukey para la relación tallo-raíz. En el análisis de la producción del número de semillas se utilizó un glm con distribución Poisson y Link (log), para analizar datos de conteos. Se comprobó que la sobredispersión tuviese valores cercanos a 1. Todos los análisis se realizaron usando el programa estadístico R (Rcore Team 2013).

Resultados

La tasa de crecimiento relativo promedio de plantas control E+ ($0,09 \text{ g día}^{-1}$) y E- ($0,12 \text{ g día}^{-1}$) (sin corte y abundante agua) no presentó diferencias. La TCR solo reveló efectos negativos de la defoliación de las plantas con buena disponibilidad de agua que portaban el endófito durante los primeros 7 días posteriores a la defoliación (Figura 6.1). Ese efecto se revirtió en el segundo periodo analizado en el que se describe un efecto similar para las plantas con y sin simbiosis en la TCR. En ambos periodos de tiempo en situaciones de sequía la tasa de crecimiento relativo de las plantas con y sin endófito no varió con respecto a la de sus controles (Figura 6.1).

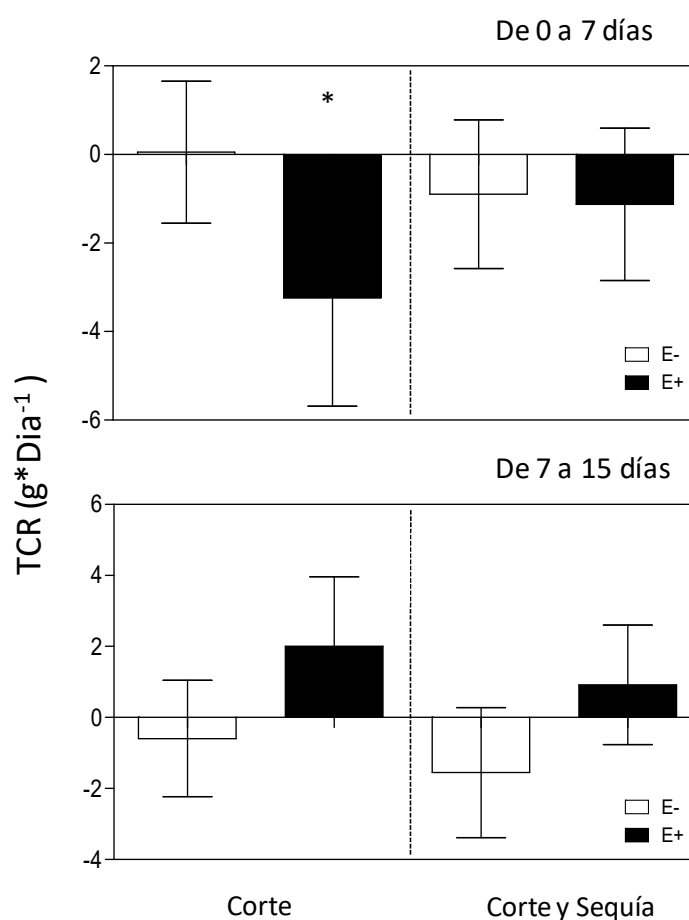


Figura 6. 1 Tamaño de efecto de los tratamientos (*d*) respecto a sus respectivos controles para la tasa de crecimiento relativo de la biomasa aérea en plantas asociadas o no con *Epichloë* y bajo distintas condiciones de crecimiento. Las barras de error son intervalos de confianza al 95%. El efecto es significativo cuando las barras de error no incluyen el 0 (*). De arriba a abajo: TCR de 0 a 7 días de los tratamientos (dentro del periodo de sequía) y TCR de 7 a 15 días (periodo de recuperación de la sequía).

Cuando evaluamos la tolerancia como la variación de biomasa (aérea, raíces y total) los encontramos que las plantas con y sin endófito en los diferentes tratamientos presentaban poca diferencia con respecto a su control, excepto por las plantas con endófito defoliadas y

con buena disponibilidad de agua, que mostraron una biomasa sensiblemente menor a sus controles no defoliados (Figura 6.2).

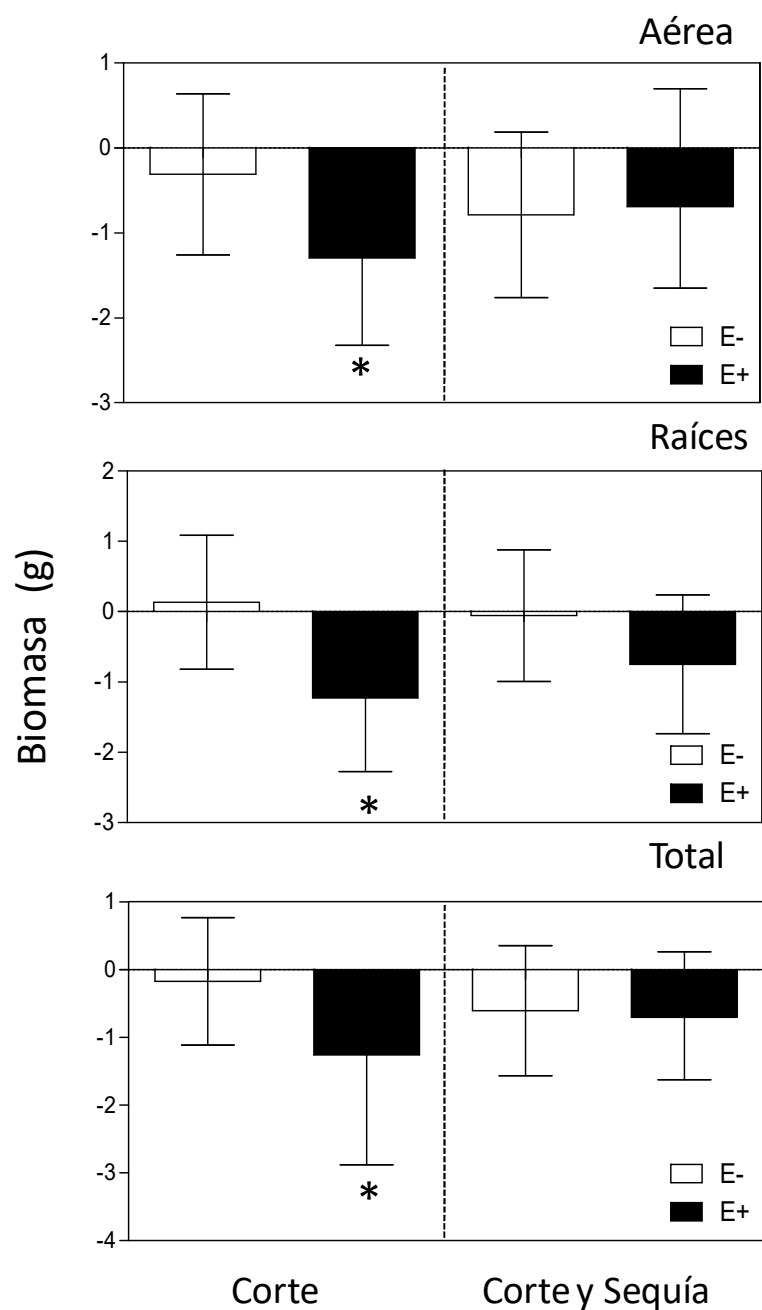


Figura 6. 2 Tamaño de efecto de los tratamientos (*d*) respecto al control para la biomasa aérea, de raíces y biomasa total. En blanco plantas sin simbiosis y en negro plantas con simbiosis. Las barras de error son intervalos de confianza al 95%. El efecto es significativo cuando las barras de error no superan el 0 (*). De arriba abajo: biomasa aérea, biomasa de raíces y biomasa total.

La relación tallo-raíz no varió entre plantas con y sin endófitos ni debido a los tratamientos (Cuadro 6.1, Anexo 4).

Cuadro 6. 1 Resultados del análisis de la varianza (ANOVA) para la relación tallo-raíz.

Tratamiento	SC	gl	CM	F	p-valor
Endófito	0,33	1	0,33	1,54	0,2198
Corte	0,69	1	0,69	3,25	0,0762
Sequía	0,06	1	0,06	0,3	0,5869
Simbiosis*corte	0,04	1	0,04	0,18	0,6734
Simbiosis*sequía	0,78	1	0,78	3,67	0,0599
Corte*sequía	0,4	1	0,4	1,89	0,174
Simbiosis*corte*sequía	0,4	1	0,4	1,88	0,1747
Error	13,55	64	0,21		
Total	16,24	71			

La producción de semillas en las plantas con endófito fue mayor en todos los tratamientos excepto en sequía, donde las plantas sin endófito produjeron mayor número de semillas. Para el tratamiento de sequía y corte no hubo diferencias entre plantas con y sin endófito (Cuadros 6.2 y 6.3).

Cuadro 6. 2 Análisis de la producción de semillas en los tratamientos, donde: *** p valor < 0,001; **p valor <0,01 y * p valor < 0,05.

	Estimado	Error estándar	Valor Z	Pr(> z)	
(Intercept)	4,58156	0,05842	78,424	< 2,00E-16	***
Simbiosis	0,67594	0,07176	9,42	< 2,00E-16	***
Corte	-0,71036	0,10177	-6,98	2,95E-12	***
Corte x Sequía	-1,43168	0,13304	-10,762	< 2,00E-16	***
Sequía	0,10979	0,08044	1,365	= 0,1723	
Simbiosis x Corte	0,29967	0,12129	2,471	= 0,0135	*
Simbiosis x Sequía x Corte	0,27407	0,15799	1,735	= 0,0828	.
Simbiosis x Sequía	-3,0986	0,20662	-14,997	< 2,00E-16	***

Cuadro 6. 3 Número de semillas de plantas con y sin simbiosis en los diferentes tratamientos (media + error estándar) (n=24).

Tratamiento	Número de semillas		
Sin simbiosis			
Control	97,67	±	36,70
Corte	48,00	±	7,77
Corte x Sequía	23,33	±	21,85
Sequía	109,00	±	24,25
Con simbiosis			
Control	192,00	±	55,77
Corte	127,33	±	66,46
Corte x Sequía	60,33	±	60,33
Sequía	9,67	±	9,67

Cuando evaluamos la respuesta de tolerancia en la producción de semillas como el efecto respecto a su control, no observamos un efecto significativo (Figura 6.3). Estos resultados fueron consistentes con el esfuerzo reproductivo de la planta (proporción del material reproductivo con respecto al vegetativo) (Figura 6.4).

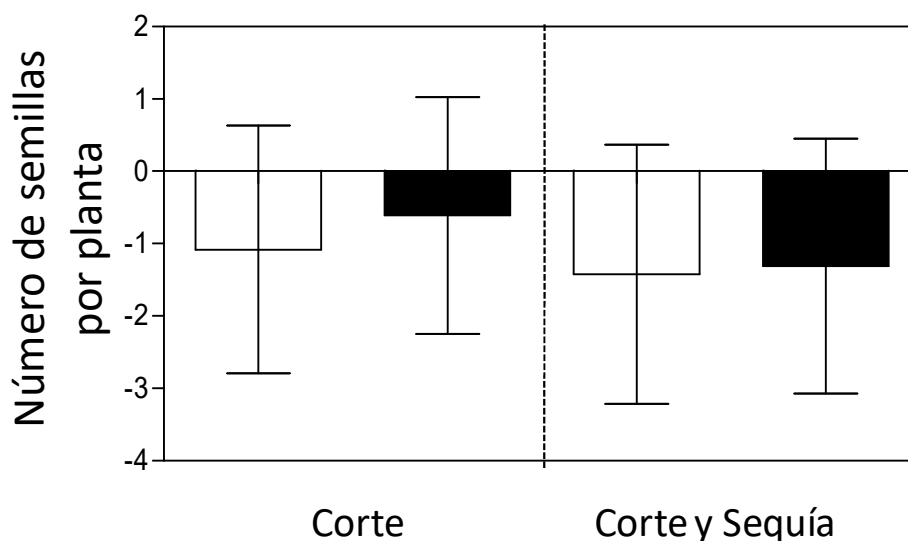


Figura 6. 3 Tamaño de efecto de los tratamientos (d) respecto al control para la producción de semillas por planta en plantas asociadas o no con *Epichloë* cultivadas bajo distintas condiciones. Las barras de error son intervalos de confianza al 95%. El efecto es significativo cuando las barras de error no superan el 0.

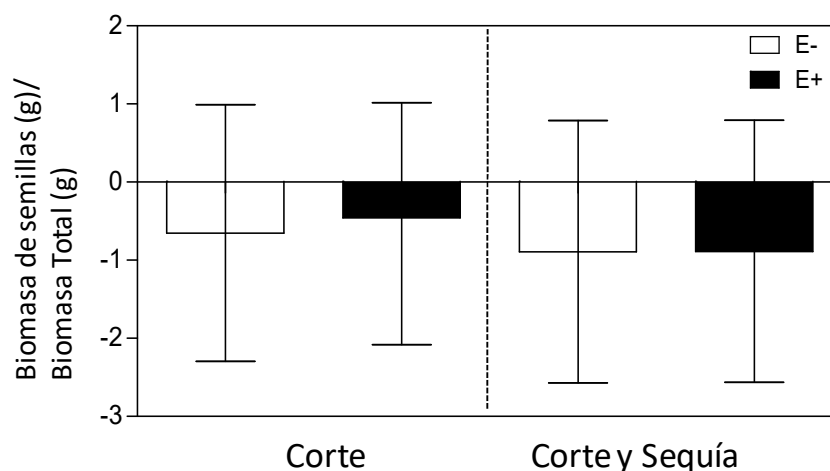


Figura 6. 4 Tamaño de efecto de los tratamientos (d) respecto al control para la proporción de biomasa reproductiva respecto del total de biomasa total (g) de plantas asociadas o no con *Epichloë* y cultivadas bajo distintas condiciones. Las barras de error son intervalos de confianza al 95%. El efecto es significativo cuando las barras de error no superan el 0.

Discusión

La simbiosis redujo la tolerancia a la defoliación bajo buena disponibilidad de agua. Estos efectos no se detectaron en las plantas que sufrieron estrés por sequía y tampoco se reflejaron en la producción de semillas.

El efecto de la simbiosis sobre la capacidad de tolerar la herbivoría ha sido poco estudiado y los escasos resultados disponibles muestran efectos contrastantes y generalmente muy dependientes del genotipo del hospedante (Belesky y Fedders 1996, Bultman et al. 2004, Spiering et al. 2006, Belesky 2008). Nuestros resultados apoyan los mostrados por Bultman et al. (2004) en *Festuca alta*, una especie perenne que, tras el corte, presenta un efecto negativo sobre la TCR de las plantas E+ en comparación con las plantas E-. Además, nuestros resultados muestran que este efecto se da en momentos próximos al corte (7 días tras el corte) diluyéndose a medida que pasa el tiempo (15 días tras el corte). En nuestro experimento, aunque las plantas E+ sufren una recuperación en la TCR a los 15 días del corte, nunca llegan a compensar e igualar la biomasa de las plantas E+ no defoliadas independientemente del tiempo de recuperación. Por otro lado, este efecto negativo temporal (de 0 a 7 días) aunque tuvo un impacto en la biomasa de la planta, no se tradujo en un impacto en la producción de semillas. Estos resultados sugieren que el mantenimiento de la simbiosis puede suponer un costo para el hospedante en el momento de reponer la biomasa removida tras el corte, es decir, un compromiso al tolerar la herbivoría disminuyendo la capacidad de compensar la biomasa removida.

La variación en la biomasa de raíces o la relación tallo-raíz puede indicar una estrategia de tolerancia mediada por la relocalización de recursos a zonas subterráneas de la planta (Stowe et al. 2000). Nuestros resultados no muestran una interacción de la simbiosis con este mecanismo de tolerancia, porque, a pesar de observarse un efecto negativo sobre la biomasa de raíces en las plantas con simbiosis, la relación tallo-raíz no se vio afectada. Esto

sugiere que la simbiosis no favorecería la relocalización de recursos tras el corte hacia la raíz como estrategia de tolerancia a la herbivoría.

El aumento en el esfuerzo reproductivo puede ser un mecanismo de tolerancia a la herbivoría (Stowe et al. 2000) especialmente importante en especies anuales como *L. multiflorum*. Los resultados muestran una producción mayor de semillas en las plantas con simbiosis en contraste a lo que se ha mostrado en la bibliografía para otras especies forrajeras como *Festuca alta* (Faeth et al. 2010, Saari et al. 2010), lo que sugiere una mayor habilidad competitiva potencial (ya que trabajé con plantas individuales) de las plantas con endófito con respecto a sus congéneres sin el hongo. Si bien nuestros resultados con plantas individuales muestran que los efectos negativos del corte sobre la acumulación de biomasa vegetativa no se tradujeron en un menor éxito reproductivo, no nos permiten hacer inferencias sobre lo que ocurriría en una situación de comunidad con competencia intra e interespecífica.

La capacidad de tolerar la herbivoría en plantas con simbiosis bajo escases de recursos está poco estudiada (Bultman et al 2004, con agregado de nitrógeno), siendo este el primer trabajo, en nuestro conocimiento, que evalúa el efecto de la sequía y la simbiosis conjuntamente sobre la capacidad de tolerar la herbivoría. Hay evidencias empíricas de que las plantas con endófitos crecen menos que las plantas sin endófitos (*Festuca arizonica*, y *Schedonorus arundinaceus*) (Morse et al. 2002, Bultman et al. 2004) pero en situaciones con sequía esta diferencia se iguala o se puede revertir (Morse et al. 2002). Nuestros resultados muestran que en situaciones de corte y sequía el efecto negativo de la simbiosis tras el corte, discutido anteriormente, se borra sin observarse efectos significativos en el crecimiento ni en la biomasa de las plantas con endófitos. Una posible explicación dentro de los modelos predominantes (los que no incorporan la simbiosis) es que en situaciones de estrés la TCR de las plantas es baja y el aumento en la TCR de la planta con corte necesario para igualar la biomasa removida es menor diluyéndose el impacto del mantenimiento de la simbiosis, a diferencia de lo documentado anteriormente en situaciones sin sequía, donde al estar cerca del máximo de crecimiento la diferencia de biomasa a recuperar tras el corte es mayor (Oosterheld y McNaughton 1991).

Como conclusión, la simbiosis puede suponer un compromiso para la tolerancia del hospedante a la defoliación. El efecto negativo a corto plazo sobre la TCR de las plantas con simbiosis fue suficiente para evitar la compensación de la biomasa removida en el corte independientemente del tiempo de recuperación, por lo que puede tener un impacto importante en el manejo de esta especie como forraje si se busca maximizar la recuperación tras el pastoreo. Además, este efecto negativo es dependiente de la disponibilidad hídrica borrándose en situaciones de sequía. Por otro lado, no se dio un compromiso en otros mecanismos de tolerancia como la producción de semillas, de gran importancia en especies anuales como *L. multiflorum* ya que es finalmente lo que determina el éxito ecológico de la población. Es por esto que a pesar de que el efecto negativo sobre la TCR puede ser de importancia productiva, desde un punto de vista ecológico no hay un efecto negativo de la simbiosis sobre la tolerancia a la herbivoría en estos pastos. Aun así, debido a la dependencia en el genotipo descrito en la literatura, serían necesarios más experimentos con diferentes cultivares para tener una mayor comprensión de estos posibles compromisos y hacer un mejor manejo de esta simbiosis.

Capítulo VII: Discusión general

En este capítulo resumo y relaciono las conclusiones y los resultados más relevantes de la tesis. Discutiré las preguntas que motivaron estos estudios, formuladas en el capítulo introductorio, a la luz de los resultados obtenidos. También abordaré el aporte de este trabajo al conocimiento y entendimiento de la simbiosis, de los beneficios o perjuicios que puede brindar, los compromisos de su mantenimiento, y cómo estos pueden depender de la interacción entre los diferentes actores y su contexto ambiental. Como conclusión del capítulo aportaré una serie de perspectivas y nuevos interrogantes que surgen de los resultados de esta tesis.

En la introducción de esta tesis se planteó una serie de preguntas que motivaron esta tesis:

- ¿Cómo es la distribución de la simbiosis en poblaciones silvestres a lo largo de gradientes ambientales?
- ¿Cómo opera el pastoreo sobre esta simbiosis y viceversa?
- ¿Cuál es el papel de la simbiosis en las estrategias de evasión y tolerancia a la herbivoría y en el compromiso entre ambas?

Durante la tesis se buscó contestar estas preguntas a través de una aproximación regional y local, usando experimentos mensurativos y manipulativos, que dieron lugar a los cinco capítulos con resultados. La relación planta-hongo aquí estudiada es muy compleja y se ve afectada por varios factores que actúan en diferentes jerarquías (Müller y Krauss 2005). Nuestra aproximación a nivel regional nos permitió identificar y jerarquizar variables ambientales como determinantes de la incidencia de la simbiosis en distintas localidades y evaluar, por primera vez, el papel de la herbivoría en escala regional. La aproximación manipulativa nos permitió estudiar el efecto de la simbiosis sobre diferentes herbívoros y la de los herbívoros sobre la simbiosis, además de estudiar la interacción en situaciones contrastantes de limitación de recursos subterráneos y aéreos (sequía y carbono). En resumen, la combinación de las dos aproximaciones nos permitió estudiar el papel del hongo en el marco de la interacción planta-herbívoro y cómo esta relación varía en situaciones de estrés y según la escala en la que se estudie (Figura 7.1).

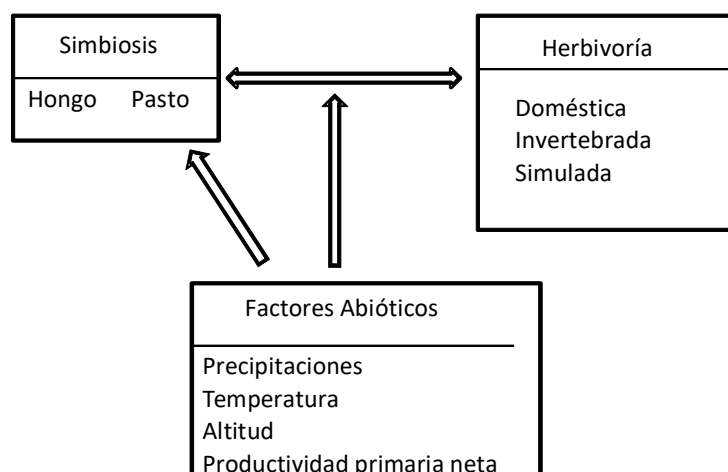


Figura 7. 1 Diagrama conceptual de la tesis, donde estudiamos: primero, el efecto de factores abióticos sobre la simbiosis; segundo, la interacción entre la simbiosis y la herbivoría; tercero, el papel de los factores ambientales sobre la interacción planta-endófito-herbívoro.

¿Cómo es la distribución de la simbiosis en poblaciones silvestres a lo largo de gradientes ambientales?

Nuestros resultados muestran cómo la distribución regional de la simbiosis está relacionada con diferentes variables ambientales y cómo la infección a lo largo de poblaciones silvestres varía en relación a estas variables (Capítulo II). La infección en poblaciones silvestres de estepas y praderas de nuestro país, ubicadas en un gradiente de latitud, de precipitaciones (de 1103mm hasta 167 mm), de productividad primaria (de $875 \text{ gC m}^{-1} \text{ año}^{-1}$ hasta $92 \text{ gC m}^{-1} \text{ año}^{-1}$), de temperatura (de 18°C hasta 9°C) y de altitud (de 2200 msnm hasta 15 msnm) aumentó con la productividad, las precipitaciones y la temperatura mientras que disminuyó con el aumento de la altitud. Nuestros resultados, en concreto la relación de la infección con la productividad y las precipitaciones (Capítulo II), sugieren que la simbiosis se ve favorecida en lugares con alta disponibilidad de recursos, donde también se produce una mayor carga de herbivoría potencial (Osterheld 1998). Es decir, por un lado, nuestros resultados parecen apoyar la hipótesis ampliamente descrita y aceptada en la literatura de que la simbiosis se ve favorecida en lugares con mayor herbivoría como consecuencia de la capacidad defensiva que aporta el hongo a los hospedantes. Pero por otro lado, contradicen otra de las hipótesis que trata de explicar la distribución de la simbiosis, donde se asume que la infección debe ser mayor en las poblaciones de los sitios más áridos debido a la capacidad tolerar la sequía que el hongo aporta al hospedante.

¿Cómo opera el pastoreo sobre esta simbiosis y viceversa?

En esta tesis describimos cómo el pastoreo afecta a la simbiosis y que este efecto varía según la especie y la palatabilidad del hospedante. Primero, analizamos cómo el pastoreo podría afectar la infección en poblaciones silvestres a lo largo de los gradientes ambientales estudiados (Capítulo II) y aunque observamos cambios en la infección en algunas especies en situaciones de pastoreo y sin pastoreo (clausuras al herbívoro doméstico), este efecto no tuvo una intensidad suficiente para modificar las relaciones observadas con las variables ambientales (Capítulo II). Segundo, analizamos cómo diferentes intensidades de pastoreo podían modificar la infección (Capítulo III), y descubrimos, contrario a lo esperado por la

relación positiva de la infección y la productividad (Capítulo II) o por lo descrito en la literatura, una reducción de la incidencia de la simbiosis bajo pastoreo intenso en especies palatables, mientras que no notamos cambios en una especie menos palatable, presumiblemente debido a la toxicidad aguda de su simbiosis (*Festuca argentina*) (Capítulo III). Además, observamos que esta disminución en la infección iba acompañada de una pérdida en la aptitud ecológica (biomasa) del hospedante. Estos resultados incorporan un factor no muy tenido en cuenta cuando se ha estudiado el efecto del pastoreo sobre la simbiosis y es la propia defensa del hospedante que puede modular la intensidad de herbivoría que recibe este (plantas menos palatables, menos preferidas por los herbívoros y, por lo tanto, sufren menor estrés que sus coetáneas).

Por otro lado, la simbiosis puede tener un efecto sobre los herbívoros aún en la ausencia de síntesis de alcaloides que generen toxicidad clínica en los animales. Los experimentos de cafetería con herbívoros domésticos y la simbiosis entre *L. multiflorum* y *E. occultans* (Capítulo IV) mostraron que la simbiosis puede modificar la preferencia de los herbívoros domésticos, aunque esta capacidad aparentemente no está relacionada ni con cambios nutricionales o estructurales de la planta, ni con la eventual producción de compuestos volátiles (Capítulo IV). Sin embargo, en los experimentos de cafetería con invertebrados (áfidos) (Capítulo V) no encontramos un efecto desalentador del consumo contundente. Más aún, en uno de los dos experimentos de cafetería con invertebrados observamos que una disminución en la disponibilidad de recursos (sequía) aumentaba la preferencia por las plantas portadoras del endófito, lo que sugiere que el estrés por sequía aumentaría la susceptibilidad de las plantas infectadas al ataque de áfidos.

¿Cuál es el papel de la simbiosis en las estrategias de evasión y tolerancia a la herbivoría y en el compromiso entre ambas?

Tal como se señaló en la introducción de esta tesis, la relación planta - herbívoro describe dos estrategias fundamentales de la planta para defenderse de la herbivoría: tolerancia y resistencia (Agrawal et al. 1999, Stowe et al. 2000). La simbiosis puede aportar capacidades relacionadas con ambas estrategias: tolerancia, mayor capacidad competitiva (Belesky y Fedders 1996, Malinowski et al. 1997, Cheplick 1998) y resistencia, producción de compuestos secundarios (Leuthmann et al. 2000). En contra de lo esperado, los resultados del capítulo VI de esta tesis no demostraron que la simbiosis aporte una mayor tolerancia a la remoción de biomasa. Por el contrario, las plantas con endófito mostraron una leve reducción de la biomasa acumulada luego de la defoliación que no exhibieron sus congéneres sin endófito (Capítulo VI). Por otro lado, nuestra indagación sobre la evasión mostró un efecto desalentador contundente en herbívoros domésticos (Capítulo IV) mientras que no mostró efectos en invertebrados (Capítulo V).

Perspectivas

Durante la tesis contestamos preguntas planteadas en la introducción, pero estas abrieron nuevos interrogantes. A partir de estos resultados planteamos algunos caminos futuros, unos con una orientación más productiva o tecnológica, con el objetivo de convertir en herramientas parte del conocimiento aportado por la simbiosis; otros más relacionados con la generación de conocimiento, que nos permitirían contestar nuevas preguntas sobre el funcionamiento y papel de la simbiosis en la relación planta - herbívoro, y los factores que

han favorecido esta simbiosis a lo largo de la evolución. Como ejemplo, resumo a continuación en forma de preguntas algunos de estos potenciales estudios:

1. *¿Bajo qué niveles de inversión en defensa del hospedante y bajo qué niveles de disponibilidad de recursos la simbiosis es realmente favorecida por el pastoreo?*

Los resultados de nuestros análisis regionales más la incorporación de la palatabilidad al marco del efecto del pastoreo sobre el mantenimiento de la simbiosis, nos plantearon este interrogante que proponemos estudiar usando como marco teórico la hipótesis de defensa óptima (Coley et al. 1985). Esta nos permitiría proponer y evaluar diferentes escenarios que nos permitirían predecir en qué situaciones la simbiosis será o no favorecida. Por ejemplo, si asumimos que el principal beneficio de la simbiosis es la defensa contra herbívoros y que bajo la hipótesis de la defensa óptima en lugares con poca disponibilidad de recursos se favorece la inversión en defensa frente a un mayor crecimiento ya que se asume un costo muy alto a la pérdida de recursos, podemos plantear el siguiente escenario: en lugares con poca disponibilidad de recursos, las plantas poco palatables reciben una menor presión de herbivoría por lo que la simbiosis no sería favorecida ya que la relación entre el beneficio de la simbiosis y el costo relativo del mantenimiento sería muy baja y podría suponer una desventaja en el uso de los recursos.

2. *¿Qué mecanismo actúa detrás del cambio de preferencia del herbívoro doméstico?*

En nuestros experimentos de los capítulos de resistencia observamos que la simbiosis puede presentar capacidades de resistencia contra herbívoros domésticos incluso cuando la simbiosis no presenta alcaloides tóxicos, pero no se pudo dilucidar qué mecanismos están detrás de este efecto. Un posible mecanismo a estudiar es la producción diferencial de volátiles. Recientes trabajos sugieren que los volátiles pueden tener un efecto importante en la resistencia contra herbívoros mamíferos (Stutz et al. 2016), y aunque en esta tesis se realizó un experimento para evaluar cómo diferentes mezclas de "olores" (experimento *oferta-base* capítulo V) podían modificar la preferencia, solo pudimos detectar el mantenimiento de la del efecto sobre la preferencia ya descrito. Por lo tanto desarrollar un conjunto de experimentos que permitan describir y evaluar el efecto de los volátiles producidos por la simbiosis sobre el herbívoro doméstico nos permitiría entender, integrar o rechazar este potencial mecanismo defensivo, y de esta forma entender mejor el papel de la simbiosis en la interacción planta - herbívoro.

3. *¿Qué efecto puede tener la simbiosis entre *Lolium multiflorum* y *Epichloë occulta* sobre la producción animal?*

En relación con esta pregunta entendemos que el camino de indagación debería incluir experimentos de consumo voluntario para evaluar si este efecto sobre la preferencia se traduce en un efecto en la producción animal. Este conocimiento nos permitirá evaluar un eventual impacto sobre la actividad ganadera y, en tal caso, nos enfrentará a la necesidad de diseñar nuevas prácticas en el manejo de esta simbiosis que eviten potenciales pérdidas en la producción.

4. *¿Este efecto sobre la preferencia es común en otras especies con importancia forrajera que establezcan simbiosis con *Epichloë*?*

Estudiar si este efecto sobre la preferencia se puede encontrar en otras especies forrajeras nos permitiría, por un lado, estudiar cuán general es la resistencia contra el

herbívoro doméstico descrita en esta tesis (capítulo IV), si es una defensa exclusiva de esta especie o es una capacidad más común dentro de la interacción planta-herbívoro-simbiosis. Por otro lado, desde un punto de vista más productivo, estos estudios nos permitirían analizar la consistencia de este efecto sobre la preferencia en las especies forrajeras, lo que puede tomar una especial relevancia al estudiar las cepas del hongo modificadas para no producir toxicidad (ejemplos de trabajos con estas cepas: Johnson et al. 2012, Gundel et al. 2013), lo que nos permitiría al incorporar esta capacidad defensiva mejorar el manejo ecológico de la simbiosis.

5. *¿Puede Festuca argentina libre de simbiosis ser una buena opción forrajera para pasturas en ambientes semiáridos?*

En el Capítulo III observamos que el efecto de la herbivoría sobre la simbiosis dependía de la palatabilidad de la especie hospedante. Detectamos que *Festuca argentina* era una especie poco preferida y que esto podía ser consecuencia de que realiza simbiosis con *Epichloë tembladerae*, que tiene la capacidad de producir alcaloides tóxicos para el ganado, y no tanto con sus características nutricionales similares a las otras especies más preferidas estudiadas (capítulo III). Por lo tanto, evaluar el rendimiento como forraje de *F. argentina* en ausencia de simbiosis podría ser relevante con el fin de generar un pasto forrajero adaptado a estos sistemas áridos.

Bibliografía

- Adler P.B., Milchunas D.G., Lauenroth W.K., Sala O.E. y Burke I.C. 2004. Functional traits of graminoids in semi-arid steppes: a test of grazing histories. *Journal of Applied Ecology* 41: 653-663.
- Afkhami M.E. 2012. Fungal Endophyte-grass symbioses are rare in the California floristic province and other regions with Mediterranean-influenced climates. *Fungal Ecology* 5:45-352.
- Afkhami M.E., McIntyre P.J. y Strauss S.Y. 2014. Mutualist-mediated effects on species' range limits across large geographic scales. *Ecology letters*, 17: 1265-1273.
- Agrawal A.A. 2000. Overcompensation of plants in response to herbivory and the by-product benefits of mutualism. *Trends in Plant Science* 5:309-313
- Agrawal A.A., Strauss S.Y. y Stout M.J. 1999. Costs of induced responses and tolerance to herbivory in male and female fitness components of wild radish. *Evolution* 53 1093-1104.
- Ares J., Beeskow A.M., Bertiller M., Rostagno M., Irisarri M., Anchorena J., Defosse G. y Merino C. 1990. Structural and dynamic characteristics of overgrazed lands of Northern Patagonia, Argentina. In: Breymeyer A.I., ed. *Managed grasslands. Ecosystems of the World*, 17A, Elsevier, Amsterdam. Pp. 149-175.
- Bacon C.W. y White J.F. Jr. 1994a. Stains, media, and procedures for analyzing endophytes. In: Bacon C.W., White J.F. Jr., eds. *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. CRC Press, Boca Raton. Pp. 47-56.
- Bacon C.W. y White J.F.J. 1994b. *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. Academic Press. 209 pp.
- Bacon C.W., Porter J.K., Robbins J.D. y Luttrell E.S. 1977. *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 576-581.
- Bailey D.W., Gross J.E., Laca E.A. Rittenhouse L.R., Coughenour M.B., Swift D.M. y Sims P.L. 1996. Mechanisms that result in large herbivore grazing distribution patterns. *J. Range Manage* 49: 386-400.
- Baldi G., Guerschman J. P., y Paruelo J. M. 2006. Characterizing fragmentation in temperate South America grasslands. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 116: 197-208.
- Bates D., Maechler M., Bolker B., Walker S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* 67: 1-48
- Bazely D.R., Ball J.P., Vicari, M., Tanentzap A.J., Berenger M., Rakocovic T. y Koh S. 2007. Broad-scale geographic patterns in the distribution of vertically-transmitted, asexual endophytes in four naturally-occurring grasses. *Ecography*, 30, 367-374.

- Bazely D.R., Vicari M., Emmerich S., Filip L., Lin D. y Inman A. 1997. Interactions between herbivores and endophyte-infected *Festuca rubra* from the Scottish Islands of St. Kilda, Benbecula and Rum. *Journal of Applied Ecology* 34: 847-860.
- Belesky D. P., Burner D. M., Ruckle J. M. 2008. Does endophyte influence resource acquisition and allocation in defoliated tall fescue as a function of microsite conditions?. *Environmental and Experimental Botany* 63: 368-377.
- Belesky D.P. y Fedders J.M. 1996. Does endophyte influence regrowth of tall fescue?. *Annals of Botany* 78:499-505.
- Bisigato A.J. y Bertiller, M.B. 1997. Grazing effects on patchy dryland vegetation in northern Patagonia. *Journal of Arid Environments* 36: 639-653.
- Blair G. 1997. Matching pastures to Australian environment. Chapter 5. In: JV Lovett, JM Scott, eds. *Pasture Production and Management*, Edition 1. Inkata Press, Victoria. Pp 88-109
- Bultman T.L. y Bell G.D. 2003. Interaction between fungal endophytes and environmental stressors influences plant resistance to insects. *Oikos* 103: 182-190.
- Bultman T.L., Bell G. y Martin W.D. 2004. A fungal endophyte mediates reversal of wound-induced resistance and constrains tolerance in a grass. *Ecology* 85: 679-685.
- Cabido M. 1985. Las comunidades vegetales de la Pampa de Achala. Sierras de Cordoba. *Documents phytosociologiques*. 9: 431-443.
- Cabido M., Ateca N., Astegiano M.E. y Anton, A.M. 1997. Distribution of C3 and C4 grasses along an altitudinal gradient in Central Argentina. 24: 197-204.
- Caño L., Escarre J., Vrieling K. y Sans F.X. 2009. Palatability to a generalist herbivore, defense and growth of invasive and native *Senecio* species: testing the evolution of increased competitive ability hypothesis. *Oecologia* 159: 95-106.
- Casabuono A. y Pomilio A.B. 1997. Alkaloids from endophyte-infected *Festuca argentina*. *Journal of Ethnopharmacology* 57: 1-9.
- Castle S.J., Mowry T.M. y Berger P.H. 1998. Differential settling by *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) on various virus infected host plants. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 91: 661-667.
- Carroll G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69: 2-9.
- Cheplick G.P. 1998. Genotypic variation in the regrowth of *Lolium perenne* following clipping: Effects of nutrients and endophytic fungi. *Functional Ecology* 12: 176-184.
- Cid M.S. y Brizuela M.A. 1994. Respuesta de bovinos y ovinos en pastoreo mixto en relación a la estructura de la pastura y la selectividad animal. *Revista Argentina de Producción Animal* 14:161-173.
- Cingolani A.M., Vaieretti M.V., Giorgis M.A., Poca M., Tecco P.A., y Gurvich D.E. 2014. Can livestock grazing maintain landscape diversity and stability in an ecosystem that evolved with wild herbivores?. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 16: 143-153.

- Cipriotti P.A. y Aguiar M.R. 2005. Effects of grazing on patch structure in a semi-arid two-phase vegetation mosaic. *Journal of Vegetation Science* 16: 57-66.
- Clay K. 1996. Interactions among fungal endophytes, grasses and herbivores. *Researches on Population Ecology* 38: 191-201.
- Clay K. y Schardl C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* 160: 99-127.
- Clay K., Holah J. y Rudgers J.A. 2005. Herbivores cause a rapid increase in hereditary symbiosis and alter plant community composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 12465-12470.
- Clement S.L., Lester D.G., Wilson A.D. y Pike K.S. 1992. Behavior and performance of *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae) on fungal endophyte-infected and uninfected perennial ryegrass. *J Econ Entomol* 85:583-588.
- Coley P.D., Bryant J.P. y Chapin F.S. 1985. Resource Availability and Plant Antiherbivore Defense. *Science* 230: 895.
- Coughenour M.B. 1985. Graminoid responses to grazing by large herbivores: adaptations, exaptations, and interacting processes. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 72:852-863.
- Crawford K.M., Land J.M. y Rudgers J.A. 2010. Fungal endophytes of native grasses decrease insect herbivore preference and performance. *Oecologia* 164:431-444.
- Curran J., Delaby L., Kennedy E., Murphy J.P., Boland T.M. y O'Donovan M. 2010. Sward characteristics, grass dry matter intake and milk production performance are affected by pre-grazing herbage mass and pasture allowance. *Livest. Sci.* 127:144-154.
- Dupont P. Y., Eaton C. J., Wargent J. J., Fechtner S., Solomon P., Schmid J., Day R.C., Scott B., y Cox M. P. 2015. Fungal endophyte infection of ryegrass reprograms host metabolism and alters development. *New Phytologist*, 208: 1227-1240.
- De Battista, J. P., Bouton, J. H., Bacon, C. W., and Siegel, M. R. (1990) Rhizome and herbage production of endophyte-removed tall fescue clones and populations. *Agronomy Journal*, 82: 651-654.
- Ehrlich P.R. y Raven P.H. 1964. Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. *Evolution* 18: 586-608.
- Faeth S. 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos* 98: 25-36.
- Faeth S. H. y Bultman T. L. 2002. Endophytic fungi and interactions among host plants, herbivores, and natural enemies. *Multitrophic level interactions*, 89-123.
- Faeth S.H. 2004. Asexual Neotyphodium endophytes in natives grasses reduce competitive abilities. *Ecol. lett.* 7:304-313.

- Faeth S.H., Hayes C.J. y Gardner D.R. 2010. Asexual Endophytes in a Native Grass: Tradeoff in Mortality, Growth, Reproduction, and Alkaloid Production. *Plant microbe interaction* 60:496-504.
- Feeny P. 1976. Plant Apparency and Chemical Defense. *Recent Advances in Phytochemistry* 10: 1-40
- Fernández, R.J., Sala O.E. y Golluscio R.A. 1991. Woody and herbaceous aboveground production of a Patagonian steppe. *Journal of Range Management* 44:434-437.
- Ferraro D.O y Oosterheld M. 2002. Effect of defoliation on grass growth. A quantitative review. *Oikos* 98:125-133
- Fletcher L.R. 1999. "Non-toxic" endophytes in ryegrass and their effect on livestock health and production. Ryegrass endophyte: an essential New Zealand symbiosis. *Grassland Research and Practice Series* 7: 133–139.
- Fletcher L.R. y Harvey I.C. 1981. An association of a *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. *New Zealand Veterinary Journal* 29: 185–186.
- García Parisi P.A., Grimoldi A.A. y Omacini M. 2014. Endophytic fungi of grasses protect other plants from aphid herbivory. *Fungal Ecology* 9: 61-64.
- Gibert A., Magda D. y Hazard L. 2012. Endophytic fungus fine-tunes the persistence strategy of its alpine host grass in response to soil resource levels. *Oikos* 122: 367–376.
- Golluscio R.A., León R.J.C. y Perelman S.B. 1982. Caracterización fitosociológica de la estepa del oeste del Chubut: su relación con el gradiente ambiental. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 21: 299-324.
- Granath G., Vicari M., Bazely D.R., Ball J.P., Puentes A. y Rakocovic T. 2007. Variation in the abundance of fungal endophytes in fescue grasses along altitudinal and grazing gradients. *Ecography* 30: 422–430.
- Gundel P.E., Batista W.B., Texeira M., Martínez-Ghersa, M.A., Omacini, M. y Ghersa C.M. 2008. *Neotyphodium* endophyte infection frequency in annual grass populations: relative importance of mutualism and transmission efficiency. *Proceedings Royal Society B* 275: 897-905.
- Gundel P.E., Garibaldi L.A., Martínez-Ghersa M.A. y Ghersa C.M. 2011b. *Neotyphodium* endophyte transmission to *Lolium multiflorum* seeds depends on the host plant fitness. *Environmental and Experimental Botany* 71: 359-366.
- Gundel P.E., Garibaldi L.A., Tognetti P.M., Aragón R., Ghersa C.M. y Omacini M. 2009. Imperfect vertical transmission of the endophyte *Neotyphodium* in exotic grasses in grasslands of the Flooding Pampa. *Microbial Ecology* 57: 740-748.
- Gundel P.E., Irisarri J.G.N., Fazio L., Casas C., y Pérez, L.I. 2016. Inferring field performance from drought experiments can be misleading: The case of symbiosis between grasses and *Epichloe* fungal endophytes. *Journal of Arid Environments* 132: 0-62.

- Gundel P.E., Pérez L.I., Helander M. y Saikkonen K. 2013. Symbiotically modified organisms: nontoxic fungal endophytes in grasses. *Trends in Plant Science* 18: 420-427.
- Gundel P.E., Rudgers J.A. y Ghersa C.M. 2011a. Incorporating the process of vertical transmission into understanding of host-symbiont dynamics. *Oikos* 120: 1121-1128.
- Hahn H., McManus M. T., Warnstorff K., Monahan B. J., Young C., Davies E., Tapper B. y Barry S. 2008. *Neotyphodium* fungal endophytes confer physiological protection to perennial ryegrass (*Lolium perenne*) subjected to a water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 63: 183-199.
- Hawkes C.V. y Sullivan J.J. 2001. The impact of herbivory on plants in different resource conditions: a meta-analysis. *Ecology* 82:2045-2058.
- Helander M., Phillips T., Faeth S. H., Bush L. P., McCulley R., Saloniemi I. y Saikkonen K. 2016. Alkaloid Quantities in Endophyte-Infected Tall Fescue are Affected by the Plant-Fungus Combination and Environment. *Journal of Chemical Ecology* 1-9.
- Hesse U., Schöberlein W., Wittenmayer L., Förster K., Warnstorff K., Diepenbrock W. y Merbach W. 2003. Effects of *Neotyphodium* endophytes on growth, reproduction and drought-stress tolerance of three *Lolium perenne* genotypes. *Grass and Forage Science* 58: 407-415.
- Hesse U., Schöberlein, W., Wittenmayer L., Förster K., Warnstorff K., Diepenbrock W. y Merbach W. 2005. Influence of water supply and endophyte infection (*Neotyphodium* spp.) on vegetative and reproductive growth of two *Lolium perenne* L. genotypes. *European Journal of Agronomy* 22: 45-54.
- Hijmans R.J., Cameron S.E., Parra J.L., Jones P.G. y Jarvis A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965-1978.
- Hoveland C.S. 1993. Importance and economic significance of the *Acremonium*-endophytes to performance of animals and grass plant. *Agricul. Ecosys. Environ* 44: 123-141.
- Huitu O., Forbes K.M., Helander M., Julkunen-Tiitto R., Lambin X., Saikkonen K., Stuart P., Sulkama S. y Hartley S. 2014. Silicon, endophytes and secondary metabolites as grass defenses against mammalian herbivores. *Frontiers in Plant Science* 5: 478, 10p.
- Iannone L.J., Irisarri J.G.N., Mc Cargo P.D., Pérez L.I. y Gundel P.E. 2015. Occurrence of *Epichloë* fungal endophytes in the sheep-preferred grass *Hordeum comosum* from Patagonia. *Journal of Arid Environments* 115: 19-26.
- Iannone L.J., Mc Cargo P.D., Giussani L.M. y Schardl C.L. 2013. Geographic distribution patterns of vertically transmitted endophytes in two native grasses in Argentina. *Symbiosis* 59: 99-110.
- Iannone L.J., White Jr. J.F., Giussani L.M., Cabral C. y Novas M.V. 2011. Diversity and distribution of *Neotyphodium*-infected grasses in Argentina. *Mycol Progress* 10: 10-19.

- Ingwell L.L., Eigenbrode S.D. y Bosque-Pérez N.A. 2012. Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Scientific Reports* 2: 578.
- Jacobo E.J., Rodríguez A.M., Rossi J.L., Salgado L.P. y Deregibus V.A. 2000. Rotational stocking and production of Italian ryegrass on Argentinean rangelands. *Journal of Range Management* 53:483-488.
- Johnson J.M., Aiken G.E., Phillips T.D., Barrett M., Klotz J.L. y Schrick F.N. 2012. Steer and pasture responses for novel endophyte tall fescue developed for the upper transition zone. *Journal of Animal Science* 90:2402-2409.
- Ju H.J., Hill N.S., Abbott T. y Ingram K.T. 2006. Temperature Influences on Endophyte Growth in Tall Fescue. *Crop science* 46: 404-412.
- Kannadan S. y Rudgers J.A. 2008. Endophyte symbiosis benefits a rare grass under low water availability. *Functional Ecology* 22: 706-713.
- Karban R. y Baldwin I.T. 2007. *Induced Response to herbivory*. Chicago, Il: University of Chicago Press.
- Knapp A.K., Hoover D.L., Wilcox K.R., Avolio M. L., Koerner S. E., La Pierre K.J., Loik M.E., Lou Y., Sala O.E. y Smith M.D. 2015. Characterizing differences in precipitation regimes of extreme wet and dry years: implications for climate change experiments. *Global Change Biology* 21:2624-2633.
- Koh S. y Hik D.S. 2007. Herbivory mediates grass-endophyte relationships. *Ecology* 88: 2752-2757.
- Laca E.A. 1998. Spatial memory and food searching mechanisms of cattle. *Journal of Range Management* 5: 370-378.
- León R.J.C, Bran D., Collantes M., Paruelo J.M. y Soriano A. 1998. Grandes unidades de vegetación de la Patagonia extra andina. *Ecología Austral* 8: 125-144.
- Leuchtman A. 1992. Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes. *Natural Toxins* 1: 150-162.
- Leuchtman A., Schmidt D. y Bush L.P. 2000. Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma-forming and seed-transmitted *Epichloë/Neotyphodium* endophytes. *Journal of Chemical Ecology* 26: 1025-136.
- Lewis G.C., Ravel C., Naffaa W., Astier C. y Charmet G. 1997. Occurrence of *Acremonium*-endophytes in wild populations of *Lolium* spp. in European countries and a relationship between level of infection and climate in France. *Annals of Applied Biology* 130: 227-238.
- Li T., Blande J.D., Gundel P. E., Helander M. y Saikkonen K. 2014. *Epichloë* Endophytes Alter Inducible Indirect Defenses in Host Grasses. *PLoS ONE*, 9: e101331.
- Luo H., Xie L., Zeng J. y Xie J. 2015. Biosynthesis and Regulation of Bioprotective Alkaloids in the Gramineae Endophytic Fungi with Implications for Herbivores Deterrents. *Current Microbiology* 71: 719-724.

- Macon B., Sollenberger L.E., Moore J.E., Staples C.R., Fike J.H. y Portier K.M. 2003. Comparison of three techniques for estimating the forage intake of lactating dairy cows on pasture. *Journal of Animal Science* 81: 57-66.
- Maddaloni, J., M. Sala, S. Carletti and R. Marquez, 1989. Efectos de fungicidas sistémicos sobre la viabilidad del hongo endofito en semilla de festuca. Informe técnico No. 225 INTA.
- Maestre F. T., Quero J. L., Gotelli N. J. Escudero A., Ochoa V., Delgado-Baquerizo M., García-Palacios P., et al. 2012. Plant species richness and ecosystem multifunctionality in global drylands. *Science* 335: 214-218.
- Malinowski D. P. y Belesky D. P. 1999. Endophyte infection affects the ability of tall fescue to use sparingly available phosphorus. *Journal of Plant Nutrition* 22: 835-853.
- Malinowski D., Leuchtmann A., Schmidt D. y Nösberger J. 1997. Symbiosis with *Neotyphodium uncinatum* endophyte may increase the competitive ability of meadow fescue. *Agronomy Journal* 89: 833-839.
- Malinowski D.P., Alloush G. A. y Belesky D.P. 2000. Leaf endophyte *Neotyphodium coenophialum* modifies mineral uptake in tall fescue. *Plant and Soil* 227: 115-126.
- Maschinski J. y Whitham T.G. 1989. The continuum of plant responses to herbivory: the influence of plant association, nutrient availability, and timing. *The American Naturalist* 134:1-19
- Massara Paletto V. 2010. Efecto de la variabilidad interanual de las precipitaciones sobre la productividad primaria neta aérea en una estepa gramínea pastoreada por ovinos. Fauba Tesis de maestría 44 pp. Escuela para graduados Alberto Soriano, Universidad de Buenos Aires.
- McNaughton S.J, Oesterheld M., Frank D.A. y Williams K.J. 1989. Ecosystem-level patterns of primary productivity and herbivory in terrestrial habitats. *Nature* 341:142-144.
- McNaughton S.J. 1983. Compensatory plant growth as a response to herbivory. *Oikos* 40:329-336.
- McNaughton S.J. 1984. Grazing lawns: animals in herds, plant form, and co evolution. *The American Naturalist* 124: 863-886.
- Meiser B., Krauss J., Härrig S.A., Schneider M.V. y Müller C.B. 2006. Fungal endosymbionts affect aphid population size by reduction of adult life span and fecundity. *Basic and Applied Ecology* 7: 244-252.
- Miranda I., Omacini M. y Chaneton E.J. 2011. Environmental context of endophyte symbioses: interacting effects of water stress and insect herbivory. *Int. J. Plant Sci.* 172: 499-508.
- Moore J.R., Pratley E., Weston L.A. y Mace W.J. 2015. Segregating endophyte infected seed from uninfected seed in annual ryegrass (*Lolium rigidum*) infected with *Epichloë occulta*. *Seed Science and Technology* 43: 40-51.

- Morse L.J., Day T. y Faeth S.H. 2002. Effect of *Neotyphodium* endophyte infection on growth and leaf gas exchange of Arizona fescue under contrasting water availability regimes. *Environmental and Experimental Botany* 48: 257-268.
- Müller C.B. y Krauss J. 2005. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current opinion in plant biology* 8:450-456.
- Novas M., Collantes M. y Cabral D. 2007. Environmental effects on grass-endophyte associations in the harsh conditions of south Patagonia. *FEMS Microbial Ecol* 61: 164-173.
- O'Donovan M. y Delaby L. 2008. Sward characteristics, grass dry matter intake and milk production performance as affected by timing of spring grazing and subsequent stocking rate. *Livestock Science* 115: 158-168.
- Oesterheld M. y McNaughton S.J. 1991. Effect of stress and time for recovery on the amount of compensatory growth after grazing. *Oecologia* 85: 305-313.
- Oesterheld M., Di Bella C. y Herdiles K. 1998. Relation between NOAA-AVHRR satellite data and stocking rate of rangelands. *Ecological Applications* 8:207-212.
- Oesterheld M., Sala O.E. y McNaughton S.J. 1992. Effect of animal husbandry on herbivore-carrying capacity at a regional scale. *Nature* 356: 234-236.
- Oliveira J.A., González E., Castro P. y Costal L. 2004. Effects of endophyte infection on dry matter yield, persistence and nutritive value of perennial ryegrass in Galicia (North-West Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research* 4: 558-563.
- Omacini M., Chaneton E.J., Bush L. y Ghersa C.M. 2009. A fungal endosymbiont affects host plant recruitment through seed- and litter-mediated mechanisms. *Functional Ecology* 23: 1148-1156.
- Omacini M., Chaneton E.J., Ghersa C.M. y Müller C.B. 2001. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature* 409: 78-81.
- Omacini M., Semmartin M., Pérez L.I. y Gundel P.E. 2012. Grass-endophyte symbiosis: a neglected aboveground interaction with multiple belowground consequences. *Applied Soil Ecology* 61: 273-279.
- Oñatibia G.R. y Aguiar M.R. 2016. Continuous moderate grazing management promotes biomass production in Patagonian arid rangelands. *Journal of Arid Environments* 125:73-79.
- Oñatibia G.R., Aguiar M.R. y Semmartin M. 2015. Are there any trade-offs between forage provision and the ecosystem service of C and N storage in arid rangelands? *Ecological Engineering* 77:26-32.
- Pazos G.E., Bisigato A.J. y Bertiller M.B. 2007. Abundance and spatial patterning of coexisting perennial grasses in grazed shrublands of the Patagonian Monte. *Journal of Arid Environments* 70: 316-328.
- Perelman S.B., León R. J. C. y Oesterheld. M. 2001. Cross-scale vegetation patterns of Flooding Pampa. *Journal of Ecology* 89: 562-577.

- Perelman S.B., León R.J.C. y Bussacca J.P. 1997. Floristic changes related to grazing intensity in a Patagonian shrub steppe. *Ecography* 20:400-406.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D y R Core Team. 2016. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-128, <http://CRAN>.
- Poca M., Harguindeguy N. P., Vaieretti M.V. y Cingolani A.M. 2014. Descomposición y calidad físico-química foliar de 24 especies dominantes de los pastizales de altura de las sierras de Córdoba, Argentina. *Ecología Austral* 24: 249-257.
- Porter J. K. 1994. Chemical constituents of grass endophytes, pp. 103–123, in C. W. Bacon, y J. F. White, Jr. (eds.). *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Porter J.K., Bacon C.W., Robbins J. D. y Betowski D. 1981. Ergot alkaloid identification in clavicipitaceae systemic fungi of pasture grasses. *J. Agric. Food Chem.* 29:653-657.
- Prestidge R.A. 1993. Causes and control of perennial ryegrass staggers in New Zealand. *Agric. Ecosyst. Environ.* 44: 283-300.
- R Core Team .2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rasmussen S., Parsons A.J., Fraser K., Xue H. y Newman J.A. 2008. Metabolic profiles of *Lolium perenne* are differentially affected by nitrogen supply, carbohydrate content, and fungal endophyte infection. *Plant Physiology* 146: 1440-1453.
- Rasmussen S., Parsons A. J., y Newman J. A. 2009. Metabolomics analysis of the *Lolium perenne*–*Neotyphodium lolii* symbiosis: more than just alkaloids?. *Phytochemistry Reviews* 8: 535-550.
- Reed K.F.M., Nie Z.N., Walker L.V. y Kearney G. 2011. Fluctuations in the concentration of ergovaline and lolitrem B produced by the wild-type endophyte (*Neotyphodium lolii*. in perennial ryegrass (*Lolium perenne*. pasture. *Animal Production Science* 51: 1098-1108.
- Rodriguez R. J., White Jr J. F., Arnold A. E. y Redman R. S. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314-330.
- Rudgers J. y Swafford A.L. 2009b. Benefits of a fungal endophyte in *Elymus virginicus* decline under drought stress. *Basic and Applied Ecology* 10: 43-51.
- Rudgers J.A. , Fletcher R.A., Olivas E., Young C.A., Charlton N.D., Pearson D.E. y Maron J.L. 2016. Long-term ungulate exclusion reduces fungal symbiont prevalence in native grasslands. *Oecologia* 181:1151-1161.
- Rudgers J.A. y Clay K. 2007. Endophyte symbiosis with tall fescue: How strong are the impacts on communities and ecosystems? *Fungal Biology Reviews* 21: 107-124.
- Rudgers J.A., Afkhami M.E, Rúa M.A., Davitt A.J., Hammer S. y Huguet V.M. 2009a. A fungus among us: broad patterns of endophyte distribution in the grasses. *Ecology* 90: 1531-9.
- Rudgers J.A., Koslow J.M. y Clay K. 2004. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecology Letters* 7: 42-51.

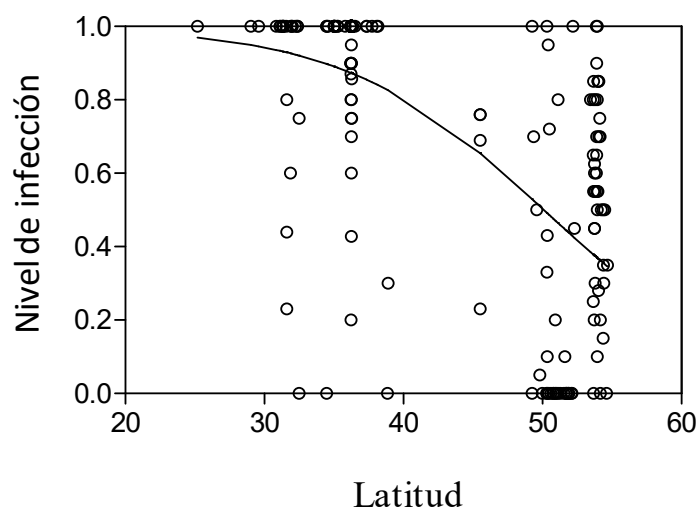
- Saari S., Helander M., Lehtonen P., Wallius E. y Saikkonen K. 2010. Fungal endophytes reduce regrowth and affect competitiveness of meadow fescue in early succession of pastures. *Grass and Forage Science* 65: 287-295.
- Saikkonen K., Faeth S.H., Helander M. y Sullivan T.J. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 319-343.
- Saikkonen K., Gundel, P.E. y Helander M. 2013. Chemical Ecology Mediated by Fungal Endophytes in Grasses. *Journal of Chemical Ecology* 39:962-968.
- Saikkonen K., Lehtonen P., Helander M., Koricheva J. y Faeth S.H. 2006. Model systems in ecology: dissecting the endophyte-grass literature. *Trends in Plant Science* 11: 428-433.
- Saikkonen K., Phillips T. D., Faeth S. H., McCulley R. L., Saloniemi I., y Helander M. 2016. Performance of Endophyte Infected Tall Fescue in Europe and North America. *PloS one*, 11: e0157382.
- Saikkonen K., Saari S. y Helander M. 2010. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? *Fungal Diversity* 41: 101-113.
- Saikkonen K., Wäli P., Helander M. y Faeth S.H. 2004. Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science* 9: 275-280.
- Sala O. E., Golluscio R.A., Lauenroth W.K. y Soriano A. 1989. Resource partitioning between shrubs and grasses in the Patagonian steppe. *Oecologia* 81: 501-505.
- Sala O.E., Parton W.J., Joyce L. A. y Lauenroth W.K. 1988. Primary production of the central grassland region of the United States. *Ecology* 69: 40-45.
- Saona N.M., Albrechtsen B.R., Ericson L. y Bazely D.R. 2010. Environmental stresses mediate endophyte-grass interactions in a boreal archipelago. *J Ecol* 98:470-9.
- Schardl C. L., Florea S., Pan J., Nagabhuyru P., Bec S. y Calie J.C. 2013. The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Plant Biology* 16: 480-488.
- Schardl C.L. y Chen F. 2010. Plant Defences against Herbivore Attack. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. www.els.net [doi: 10.1002/9780470015902.a0001324.pub2]
- Schardl C.L. y Wilkinson H.H. 2000. Hybridization and cospeciation hypotheses for the evolution of grass endophytes - Microbial endophytes. Marcel Dekker, New York, chapter 4: 63-83.
- Schardl C.L., Grossman R.B., Nagabhuyru P., Faulkner J.R., y Malliky U.P. 2007. Loline alkaloids: currencies of mutualism. *Phytochemistry* 68: 980-996.
- Schardl C.L., Young C. A., Faulkner J. R., Florea S. y Pan J. 2012. Chemotypic diversity of *Epichloë*, fungal symbionts of grasses. *Fungal Ecology* 5: 331-344.
- Schardl C.L., Young C.A., Faulkner J.R., Florea S. y Pan J. 2012. Chemotypic diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses. *Fungal Ecology* 5: 331-344.
- Semmartin M., Aguiar M.R., Distel R.A., Moretto A.S. y Ghersa C.M. 2004. Litter quality and nutrient cycling affected by grazing-induced species replacements along a precipitation gradient. *Oikos* 107: 148-160.

- Semmartin M., Omacini M., Gundel P.E. y Hernández-Agramonte I.M. 2015. Broad-scale variation of fungal-endophyte incidence in temperate grasses. *Journal of Ecology* 183:184-190.
- Senft R. L., Coughenour, M. B., Bailey, D.W., Rittenhouse, L.R., Sala, O.E., y Swift, D.M. 1987. Large herbivore foraging and ecological hierarchies. *BioScience* 37: 789-799.
- Shaw R.G. y Mitchell-Olds T. 1993. Anova for Unbalanced Data: An Overview. *Ecology* 74: 1638-1645.
- Smit H.J., Tamminga S. y Elgersma A. 2006. Dairy Cattle Grazing Preference among Six Cultivars of Perennial Ryegrass. *Agronomy Journal* 98:1213-1220.
- Solmo R., Durañona C. y Ortiz R. 1985. Valor nutritivo de especies forrajeras patagónicas. *Revista Argentina Producción Animal* 5: 589-605.
- Solomon J.K.Q., Macoon B.L, David J.V., Rhonda C. y Ward S. 2014. Cattle Grazing Preference among Tetraploid and Diploid Annual Ryegrass Cultivars. *Crop Science* 54: 430-438.
- Soto-Barajas M.C., Zabalgogezcoa I., Gómez-Fuertes J., Gónzales-Blanco V. y Vazquez de Aldana B.R. 2015. *Epichloë* endophytes affect the nutrient and fiber content of *lolium perenne* regardless of plant genotype. *Plant Soil*: 1-13.
- Spiering M.J., Greer D.H. y Schmid J. 2006. Effects of the fungal endophyte, *Neotyphodium lolii*, on net photosynthesis and growth rates of perennial ryegrass (*Lolium perenne*. are independent of In Planta endophyte concentration. *Annals of Botany* 98:379-387.
- Stowe K.A., Marquis R.J., Hochwender C.G. y Simms E.L. 2000. The evolutionary ecology of tolerance to consumer damage. *Annual Review of Ecology Syst.* 31: 565-595.
- Stutz R. S., Banks P. B., Proschogo N., y McArthur C. 2016. Follow your nose: leaf odour as an important foraging cue for mammalian herbivores. *Oecologia* 1-9.
- Thompson J.N. 1988. Coevolution and Alternative Hypotheses on Insect/Plant Interactions. *Ecology* 69: 893-895.
- Torres A. 2016. Efecto de la simbiosis hongo endófito - pasto sobre el intercambio neto de carbono del suelo. Tesis de grado
<http://ri.agro.uba.ar/files/intranet/intensificacion/2016torresagostina.pdf>.
- Uchitel A., Omacini M. y Chaneton E.J. 2011. Inherited fungal symbionts enhance establishment of an invasive annual grass across successional habitats. *Oecologia* 165:465-475.
- Ueno A.C., Gundel P.E., Omacini M., Ghera C.M., Bush L.P. y Martínez-Ghera M. A. 2015. Mutualism effectiveness of a fungal endophyte in an annual grass is impaired by ozone. *Functional Ecology* 30: 226-234.
- Van Soest P.J., Robertson J.B. y Lewis B.A. 1991. Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.

- White J.F. Jr, Sullivan R.F., Balady G.A., Gianfagna T.J., Yue Q., Meyer W.A. y Cabral D. 2001. A fungal endosymbiont of grass *Bromus setifolius*: distribution in some Andean populations, identification and examination of beneficial properties. *Symbiosis* 31:241-257.
- Yates S. G., Fenster J. C. y Bartelt R.J. 1989. Assay of tall fescue seed extracts, fractions, alkaloids using the large milkweed bug. *J. Agric. Food Chem.* 37:354-357.
- Young C.A., Hume D.E. y McCulley R.L. 2013. Fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: pasture friend or foe? *Journal of Animal Ccience* 91:2379-2394.
- Yule K.M., Woolley J.B. y Rudgers J. 2010. Water availability alters the tri-trophic consequences of a plant-fungal simbiosis. *Arthropod-Plant Interactions* 5:19-27.
- Zabalgogezcoa I., Garcia Ciudad A., Vázquez de Aldana B.R. y García Criado B. 2006. Effects of the infection by the fungal endophyte *Epichloë festucae* in the growth and nutrient content of *Festuca rubra*. *Eur J Agron* 24: 374-384.
- Zhao M., Heinsch F.A., Nemani R.R. y Runnin S.W. 2005. Improvements of the MODIS terrestrial gross and net primary production global data set. *Remote Sensing of Environment* 95: 164-176.

Anexos

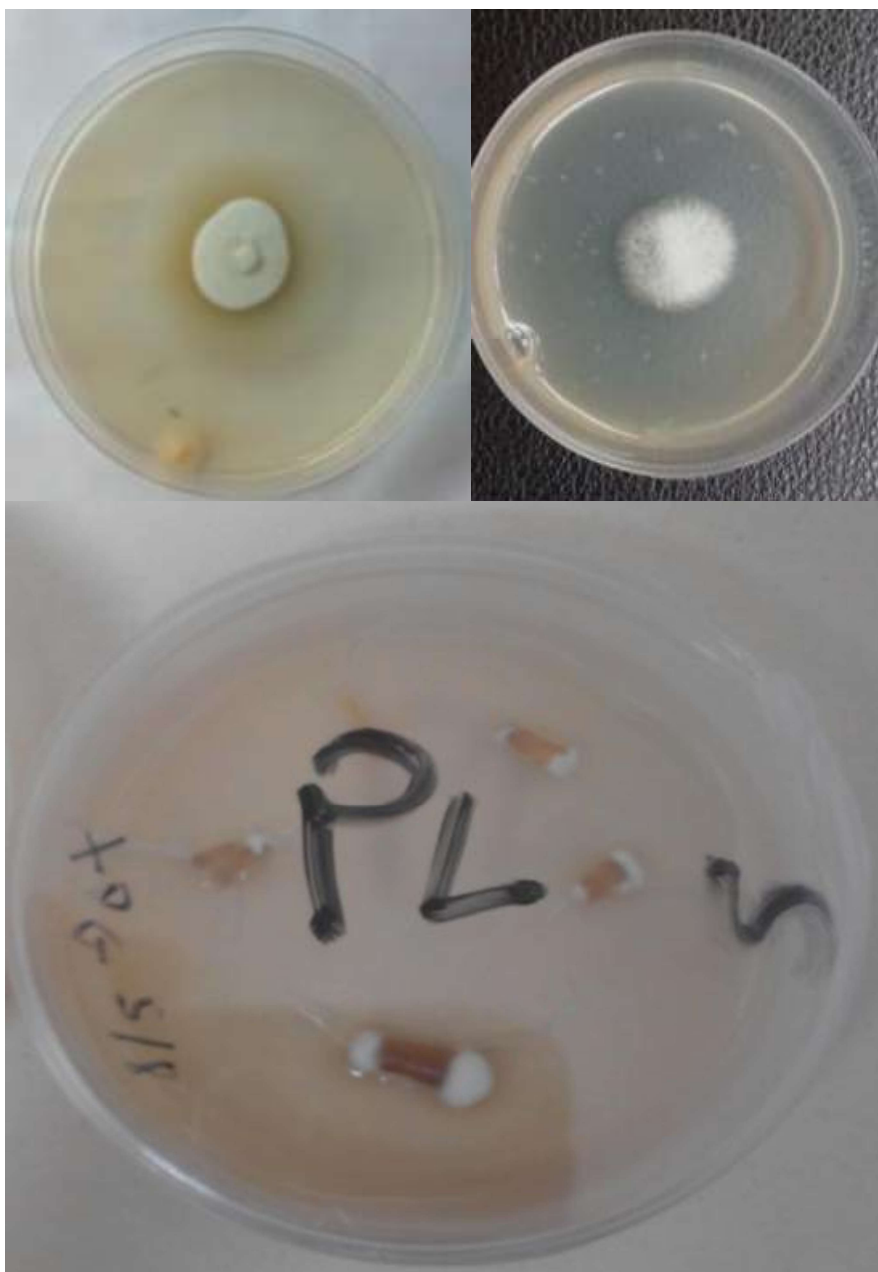
Anexo 1 Infección respecto a la latitud (en valor absoluto)($F_{1-180}= 48.35$, $p<0.001$).



Anexo 2 Correlación de Pearson de las variables usadas en el análisis de importancia y la latitud.

Variables	Latitud
Productividad	0,71
Precipitaciones	0,85
Temperatura	0,95
Altitud	0,01

Anexo 3 Ejemplo de morfotipos aislados de *Epichloë* en diferentes especies de pastos a lo largo del gradiente.



Anexo 4 Relación tallo-raíz de las plantas con y sin simbiosis en los diferentes tratamientos en los 3 momentos de cosecha (media \pm ee) (n = 3).

7 días desde el corte				15 días desde el corte			30 días desde el corte		
Tallo/Raíz				Tallo/Raíz			Tallo/Raíz		
Sin simbiosis									
Control	1,91	±	0,42	1,85	±	0,36	2,55	±	0,47
Corte	2,00	±	0,42	1,72	±	0,23	1,87	±	0,11
Sequía	2,01	±	0,09	1,71	±	0,17	1,79	±	0,32
SxC	1,44	±	0,16	1,61	±	0,08	1,74	±	0,15
Con simbiosis									
Control	2,03	±	0,20	2,07	±	0,16	2,30	±	0,37
Corte	1,44	±	0,08	1,50	±	0,07	2,12	±	0,05
Sequía	1,85	±	0,27	2,22	±	0,18	1,88	±	0,10
SxC	1,75	±	0,25	1,83	±	0,13	2,81	±	0,35

Anexo 5 Biomasa aérea y de raíces de las plantas con y sin simbiosis en los diferentes tratamientos en los 3 momentos de cosecha. (Media \pm ee) (n = 3).

7 días desde el corte							15 días desde el corte						30 días desde el corte					
Biomasa raíz			Biomasa aérea				Biomasa raíz			Biomasa aérea			Biomasa raíz			Biomasa aérea		
Sin simbiosis																		
Control	0,41	±	0,05	0,75	±	0,09	0,69	±	0,17	1,15	±	0,14	0,42	±	0,04	1,10	±	0,31
corte	0,40	±	0,11	0,72	±	0,12	0,52	±	0,04	0,88	±	0,05	0,61	±	0,14	1,15	±	0,29
Corte X sequía	0,44	±	0,17	0,64	±	0,24	0,44	±	0,07	0,71	±	0,14	0,44	±	0,04	0,76	±	0,02
Sequía	0,36	±	0,10	0,71	±	0,17	0,32	±	0,08	0,56	±	0,18	0,52	±	0,03	0,94	±	0,20
Con simbiosis																		
control	0,48	±	0,11	1,01	±	0,31	0,41	±	0,12	0,84	±	0,23	0,72	±	0,18	1,77	±	0,70
corte	0,22	±	0,06	0,31	±	0,09	0,40	±	0,12	0,59	±	0,15	0,35	±	0,06	0,73	±	0,10
Corte X sequía	0,39	±	0,08	0,73	±	0,22	0,43	±	0,12	0,78	±	0,23	0,25	±	0,08	0,65	±	0,16
Sequía	0,28	±	0,07	0,55	±	0,20	0,48	±	0,07	1,04	±	0,11	0,54	±	0,09	1,02	±	0,16